



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO ULTRASSONOGRÁFICO DE ALGUNS ASPECTOS DA DINÂMICA OVÁRICA EM  
VACAS DA RAÇA FRÍSLIA HOLSTEIN SUJEITAS A VÁRIOS PROTOCOLOS DE INDUÇÃO  
DE OVULAÇÃO

GONÇALO DA SILVA PEREIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa  
Doutor José Ricardo Dias Bexiga  
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor João Nestor das Chagas e  
Silva

2013

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO ULTRASSONOGRÁFICO DE ALGUNS ASPECTOS DA DINÂMICA OVÁRICA EM  
VACAS DA RAÇA FRÍSLIA HOLSTEIN SUJEITAS A VÁRIOS PROTOCOLOS DE INDUÇÃO  
DE OVULAÇÃO

GONÇALO DA SILVA PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa  
Doutor José Ricardo Dias Bexiga  
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

ORIENTADOR

Doutor João Nestor das Chagas e  
Silva

2013

LISBOA

---

Aos meus pais e irmã.

## AGRADECIMENTOS

Ao Doutor João Nestor Chagas e Silva, não só pelos conselhos e ensinamentos transmitidos, mas também pelos momentos de amizade. No verdadeiro sentido da palavra foi um Professor durante este ano a quem devo muito e por quem tenho muito respeito. Certamente um amigo no futuro.

Ao Dr. Jorge Evangelista, pela sua disponibilidade para me receber e me transmitir o seu conhecimento em situações práticas do dia-a-dia da clinica de bovinos.

À Professora Doutora Isabel Neto Fonseca pela ajuda fundamental no tratamento e análise estatística dos dados.

À casa Agrícola Policarpo por me ter aceitado como estagiário e financiado o estudo que deu origem a esta dissertação de mestrado.

Ao Nuno, Vergílio e Luís devo não só um agradecimento pelo apoio e pelos ensinamentos transmitidos ao longo do meu estágio mas também pelos momentos de convívio que desfrutei ao longo deste.

À minha mãe, com quem aprendi a importância da disciplina e regras para alcançar os meus objectivos.

Ao meu pai, por me ter ensinado que a persistência e a paciência são das ferramentas mais importantes para chegar onde desejo.

À minha irmã pelo seu papel de irmã mais velha que a muita paciência obrigou.

À minha namorada Francisca por todo o carinho e compreensão, principalmente durante as épocas de exames.

Ao Tiago, Bruno e Diogo mais que amigos são uma segunda família sem o apoio dos quais muitas vezes não teria sido possível.

Ao Lobo, João, Zé e Lagoa pela amizade nos momentos bons e maus desta etapa, uns amigos para a vida.

À Nélia, Marlene e Inês por todo o apoio e momentos de amizade não só durante o estágio como durante todo o curso.

# **Estudo ultrassonográfico de alguns aspectos da dinâmica ovárica em vacas da raça Frísia Holstein sujeitas a vários protocolos de indução de ovulação**

## **RESUMO**

Esta dissertação abordou vários temas da área de reprodução bovina, nomeadamente inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e ultrassonografia. Após um enquadramento teórico onde se pode consultar uma revisão sobre os fundamentos e aplicações reprodutivas da ultrassonografia em bovinos, fez-se a apresentação do trabalho experimental realizado.

O objectivo deste ensaio foi o de estudar a dinâmica ovárica resultante de cada um dos protocolos de IATF seleccionados (Ovsynch e Doublesynch), de maneira a tentar detectar diferenças nas dimensões das estruturas ováricas que pudessem justificar as eventuais diferenças de fertilidade entre eles. Ao mesmo tempo, analisou-se a possibilidade da existência de uma relação entre as dimensões dos folículos dominantes e dos corpos lúteos deles resultantes em diferentes dias após a inseminação, assim como, entre as dimensões dos mesmos e a probabilidade das vacas ficarem gestantes.

Os resultados do presente ensaio permitiram constatar que vacas que ovulam espontaneamente após a regressão lútea induzida por prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , apresentaram um folículo pré-ovulatório de dimensões superiores aos das vacas submetidas a protocolos de sincronização de ovulação. Não foram detectadas quaisquer diferenças ao nível das dimensões das estruturas ováricas entre os diferentes protocolos de sincronização de ovulações que justificassem as diferenças de fertilidade descritas por outros autores, assim como quaisquer correlações entre as variáveis estudadas. Entre outras razões, esta ausência de diferenças pode ficar a dever-se à reduzida amostra do ensaio ( $n=15$ , para cada um dos grupos). Quanto à existência de uma relação entre as dimensões das estruturas e a probabilidade das vacas ficarem gestantes, apenas foi detectada uma relação com as dimensões do corpo lúteo aos 14 dias após a inseminação artificial.

Assim, pode concluir-se que para a detecção de diferenças estatisticamente significativas a nível das dimensões das estruturas ováricas de vacas sujeitas a diferentes protocolos de sincronização de ovulação, teria sido ideal a utilização de grupos de uma maior dimensão.

**Palavras-chave:** Ultrassonografia; inseminação artificial em tempo fixo; Ovsynch; Doublesynch; Folículo Dominante; Corpo Lúteo.

# **Ultrasonografic study of some aspects of the ovarian dynamic in Holstein Frisian cows submitted to several fixed time artificial insemination protocols**

## **ABSTRACT**

This dissertation approached several subjects of bovine reproduction, namely fixed time artificial insemination and ultrasonography. After a theoretical framework where it can be consulted a review on ultrasound basis and his applications on bovine reproduction there's a description of the experimental trial.

The purpose of this trial was to study the ovarian dynamics resulting from each of the selected fixed time artificial insemination protocols (Ovsynch e Doublesynch), in order to detect possible differences in the dimensions of ovarian structures that might justify the differences in fertility. At the same time we tried to verify the existence of a relationship between the size of dominant follicles and corpora lutea at different days post insemination as well as between the same dimensions and the probability of cows becoming pregnant.

The results of this trial showed that cows which ovulate spontaneously after luteal regression induced by prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , had a pre-ovulatory follicle larger than those of cows undergoing a protocol of ovulation synchronization. No differences were found in the size of ovarian structures between the different ovulation synchronization protocols that justify the differences in fertility described, as well as any correlations between variables, among other reasons this lack of difference may be due to the reduced sample ( $n = 15$  for each group). As for the existence of a relationship between the dimensions of the structures and the probability of cows becoming pregnant, only the size of the corpus luteum at 14 days post insemination showed to have a correlation.

Thus, it can be concluded that for the detection of statistically significant differences in the dimensions of ovarian structures of cows submitted to different ovulation synchronization protocols, it would be ideal to use larger groups.

**Keywords:** Ultrasonography, fixed-time artificial insemination; Ovsynch; Doublesynch; Dominant Follicle; Corpus Luteum.

## ÍNDICE GERAL

Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Índice geral .....	iv
Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas.....	viii
Índice de gráficos.....	viii
Índice de abreviaturas.....	ix
Objectivos .....	1
Relatório de actividades desenvolvidas ao longo do período de estágio.....	2
1 Generalidades sobre ultrassonografia.....	5
1.1 Nota histórica .....	6
1.2 Princípios básicos de ultrassonografia.....	7
1.2.1 Propriedades físicas dos ultra-sons (US) .....	7
1.2.2 Formação dos ultra-sons.....	8
1.2.3 Como se formam os ecos .....	9
1.2.4. Atenuação dos ultra-sons.....	9
1.2.4.1 Refracção dos ultra-sons .....	10
1.2.4.2 Difusão dos ultra-sons .....	10
1.2.4.3 Absorção dos ultra-sons .....	10
1.3. Composição e funcionamento do ecógrafo.....	10
1.4 Tipos de sonda.....	12
1.5 Poder de resolução .....	14
1.5.1 Resolução axial.....	14
1.5.2 Resolução lateral .....	14
1.6 Modos de apresentação de imagem.....	15
1.6.1 Modo A .....	15
1.6.2. Modo B .....	15
1.6.2.1 Modo B em tempo real .....	16
1.6.3 Modo M.....	16
1.7 Artefactos .....	16
1.8 Selecção do equipamento .....	20
1.9 Tecnologias auxiliares .....	21
1.9.1 Doppler .....	21
1.9.2 Análise computadorizada das imagens ecográficas.....	22
2 Aplicações reprodutivas da ultrassonografia em bovinos .....	23
2.1 Fisiologia do ciclo éstrico.....	24
2.1.1 Metaestro.....	25
2.1.2 Diestro .....	25
2.1.3 Proestro .....	26
2.1.4 Estro .....	27



2.1.5 Dinâmica folicular.....	28
2.2 Avaliação ultrassonográfica dos ovários.....	29
2.2.1 Estruturas fisiológicas .....	29
2.2.1.1 Folículos.....	29
2.2.1.2 Corpo Lúteo.....	31
2.2.2 Estruturas Patológicas .....	33
2.2.2.1 Tumores da granulosa e teca .....	33
2.2.2.2 Estruturas quísticas .....	33
2.3 Avaliação ultrassonográfica do útero.....	34
2.3.1 Avaliação ultrassonográfica do útero não gravídico .....	34
2.3.1.1 Determinação da fase do ciclo éstrico .....	34
2.3.1.2 Diagnóstico de patologia uterina.....	35
2.3.2 Diagnóstico de gestação.....	36
2.3.2.1 Determinação do número de fetos.....	38
2.3.2.2 Determinação do sexo fetal .....	40
2.4 Avaliação ultrassonográfica da função reprodutiva do touro.....	42
2.4.1 Técnica .....	42
2.4.2 Aspecto ultrassonográfico dos testículos e escroto.....	43
2.4.3 Utilidade de um exame ultrassonográfico como complemento do exame andrológico convencional .....	43
2.5 Aplicações do modo Doppler em reprodução bovina.....	44
2.6 Punção folicular ecoguiada.....	46
3 Aplicações da ultrassonografia em protocolos de iatf.....	47
4 Trabalho experimental .....	50
4.1 Introdução .....	51
4.2 Material e métodos.....	56
4.2.1 Animais e meio ambiente.....	56
4.2.2 Delineamento experimental .....	56
4.2.3 Registo de dados .....	58
4.2.4 Detecção de cios e IA .....	59
4.2.5 Análise estatística .....	59
4.3 Resultados .....	60
4.4 Discussão.....	66
4.4.1 Relação entre a variável “Diâmetro do folículo (mm)” e os diferentes grupos.....	66
4.4.2 Relação entre as variáveis “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm <sup>2</sup> )”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm <sup>2</sup> )” e “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm <sup>2</sup> )” e os diferentes grupos .....	67
4.4.3 Correlação entre as variáveis “Diâmetro do folículo (mm)” e “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm <sup>2</sup> )”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm <sup>2</sup> )”, “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm <sup>2</sup> )” e “Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)” .....	67
4.4.4 Relação entre as variáveis “Diâmetro do folículo (mm)”, “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm <sup>2</sup> )”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm <sup>2</sup> )” e “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm <sup>2</sup> )” e os grupos DG+ e DG-.....	68

4.4.5 Estudos de caso .....	71
4.4.6 Crítica .....	72
4.5 Conclusões.....	73
5 Bibliografia .....	74
6 Anexos.....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Processamento e visualização de embriões à lupa. Original do autor.....	3
Figura 2. Características da onda sonora. Adaptado de Williams (2012). ....	8
Figura 3. Tipos de sondas ultrassonográficas. Adaptado de Nyland <i>et al.</i> (2002). ....	13
Figura 4. Esquema dos diferentes tipos de resolução. Adaptado de Mannion (2006). ....	15
Figura 5. Esquema da formação do artefacto de sombra acústica. Adaptado de Lang (2006b). ....	17
Figura 6. Imagem ultrassonográfica de sombra acústica. Adaptado de Gayrard <i>et al.</i> (2010). ....	17
Figura 7. Esquema da formação dos artefactos de reforço acústico posterior e de sombra lateral. Adaptado de Lang (2006b). ....	18
Figura 8. Imagem ultrassonográfica de ovário com folículos apresentando artefactos de reforço acústico posterior e sombra lateral. Adaptado de Gayrard <i>et al.</i> (2010). ....	18
Figura 9. Esquema da formação do artefacto de reverberação. Adaptado de Lang (2006b). ....	19
Figura 10. Imagem ultrassonográfica de artefacto de reverberação. Adaptado de Gayrard <i>et al.</i> (2010). ....	19
Figura 11. Esquema da formação do artefacto de imagem de espelho. Adaptado de Lang (2006b). ....	20
Figura 12. Imagem ultrassonográfica de útero grávido com artefacto de imagem de espelho. Adaptado de Gayrard <i>et al.</i> (2010). ....	20
Figura 13. Fases do ciclo éstrico da fêmea bovina. Retirado de Senger (2005). ....	25
Figura 14. Esquema das ondas de crescimento folicular durante o ciclo éstrico, ciclo de duas ondas. Retirado de Jeffrey (2007). ....	28
Figura 15. Imagem ultrassonográfica de folículo (F) num ovário em contraste com a bexiga (U). Retirado de Kahn <i>et al.</i> (2004). ....	30
Figura 16. Imagens ultrassonográficas e secções de corte de CL cavitário (esquerda) e CL maciço (direita). Retirado de Kahn <i>et al.</i> (2004). ....	32
Figura 17. Imagem ultrassonográfica de quisto folicular (esquerda) e quisto luteínico (direita). Adaptado de Quintela <i>et al.</i> (2006). ....	33
Figura 18. Imagem ultrassonográfica de cortes transversal (A) e longitudinal (B) de útero em estro. Retirado de DesCôteaux <i>et al.</i> (2010c). ....	35
Figura 19. Imagem ultrassonográfica de cortes de útero em diestro nos dias 8 (A) e 15 (B) do ciclo. Retirado de DesCôteaux <i>et al.</i> (2010c). ....	35
Figura 20. Imagem ultrassonográfica de gestação de 30 dias. Retirado de DesCôteaux <i>et al.</i> (2010b). ....	38
Figura 21. Imagem ultrassonográfica de gestação gemelar de 30 dias. Retirado de DesCôteaux <i>et al.</i> (2010b). ....	39
Figura 22. Imagem ultrassonográfica de feto fêmea com 60 dias. Retirado de DesCôteaux <i>et al.</i> (2010a). ....	41
Figura 23. Imagem ultrassonográfica de feto macho com 68 dias. Retirado de DesCôteaux <i>et al.</i> (2010a). ....	41
Figura 24. Imagem ultrassonográfica em modo Doppler das vascularização do CL de uma vaca em diestro. Retirado de Herzog e Bollwein (2007). ....	45
Figura 25. Exemplo de protocolo ressincronização para IATF. Original do autor. ....	49
Figura 26. Esquema dos procedimentos do G-PG. Original do autor. ....	57
Figura 27. Esquema dos procedimentos do G-OVS. Original do autor. ....	57
Figura 28. Esquema dos procedimentos do G-DOVS. Original do autor. ....	57
Figura 29. Ecógrafo Ultrascan 900, AMI, Canadá .....	58
Figura 30. Esquema da rotina de ultrassonografias. Original do autor .....	58
Figura 31. Imagem ultrassonográfica da medição do diâmetro do FD no dia da IA. Original do autor. ....	58
Figura 32. Imagem ultrassonográfica da medição da área total do CL no dia 7. Original do autor. ....	59
Figura 33. Imagem ultrassonográfica da medição da área da cavidade de um CL no dia 7. Original do autor. ....	59

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resumo de actividades realizadas no estágio.....	4
Tabela 2. Resumo dos dados do presente estudo. ....	84

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição da variável "Diâmetro do Folículo (mm)" entre os diferentes grupos. ....	60
Gráfico 2. Análise das diferenças da distribuição da variável "Diâmetro do Folículo (mm)" nos diferentes grupos organizados por pares. ....	61
Gráfico 3. Distribuição da variável "Área do Corpo Lúteo-D7 (cm <sup>2</sup> )" entre os diferentes grupos.....	62
Gráfico 4. Distribuição da variável "Área do Corpo Lúteo-D14 (cm <sup>2</sup> )" entre os diferentes grupos.....	62
Gráfico 5. Distribuição da variável "Diferença da Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm <sup>2</sup> ) " entre os diferentes grupos. ....	63
Gráfico 6. Distribuição da variável "Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L) entre os diferentes grupos." .....	64
Gráfico 7. Distribuição da variável "Área do Corpo Lúteo-D14 (cm <sup>2</sup> )" entre os grupos DG+ e DG-.....	65

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3 $\beta$ -HSD – 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase  
ADS – Agrupamento de defesa sanitária  
CC – condição corporal  
CL – corpo(s) lúteo(s)  
CLC - corpo(s) lúteo(s) cavitário(s)  
cm – centímetro(s)  
dB – decibéis  
DG – diagnóstico de gestação  
FL – folículo  
FD – folículo dominante  
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária  
FSH – hormona folículo-estimulante  
GH – hormona do crescimento  
GnRH – hormona libertadora de gonadotrofinas  
gr – grama(s)  
Hz – hertz  
IA – inseminação artificial  
IATF – inseminação artificial em tempo fixo  
IGF – factor de crescimento semelhante à insulina  
Kg – quilograma(s)  
LH – hormona luteinizante  
mm – milímetro(s)  
OMTE – ovulação múltipla e transferência de embriões  
PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  – prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>   
PGE2 - prostaglandina E2  
PTR – palpação transrectal  
s – segundo(s)  
STAR – proteína reguladora da esteróidogénese aguda  
TE – transferência de embriões  
TNF $\alpha$  – factor de necrose tumoral  
US – ultrassons  
v - velocidade  
W - watts  
Z - impedância acústica



## OBJECTIVOS

Nos últimos anos, o sector leiteiro bovino em Portugal tem sofrido alterações profundas. As pequenas explorações familiares têm vindo a encerrar ou a crescer de maneira a poderem tornar-se economicamente viáveis. As reduzidas margens de lucro têm vindo a pressionar os produtores para se tornarem cada vez mais informados. E, actualmente, as explorações que se mantêm em funcionamento, exigem um elevado nível de conhecimento e formação por parte dos técnicos que nelas trabalham. Estes dois factores, o aumento da dimensão média das explorações e a necessidade do recurso a técnicos especializados, vieram criar, no país, uma nova saída profissional para os futuros médicos veterinários. Apesar de noutras latitudes, onde este sector se encontra mais industrializado, o cargo de veterinário residente na exploração ser comum há já muito tempo, em Portugal o mercado não estava ainda organizado de maneira a tornar esta posição interessante, tanto para o técnico, como para o dono da exploração. Foi com base nesta interpretação da situação actual do sector leiteiro em Portugal que foi decidido ficar a tempo inteiro numa exploração de bovinos leiteiros, de maneira a poder acompanhar as suas rotinas normais de trabalho que, muitas vezes, escapam aos técnicos que apenas aí se deslocam, quando o produtor tem alguma emergência ou numa visita de controlo reprodutivo. O tema para esta dissertação de mestrado foi escolhido com o intuito de adquirir e aprofundar conhecimentos nas áreas de ultrassonografia reprodutiva e de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Estas duas áreas podem ter um papel muito importante ao fazerem face aos desafios que actualmente a reprodução bovina apresenta aos médicos veterinários.

Os objectivos deste estudo foram:

- Avaliar a influência de diferentes protocolos de IATF nas dimensões, tanto dos folículos (FL), como dos corpos lúteos (CL) que deles resultaram.
- Avaliar a influência das dimensões dos folículos pré-ovulatórios e dos corpos lúteos resultantes na probabilidade de originar uma gestação.

## RELATÓRIO DE ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS AO LONGO DO PERÍODO DE ESTÁGIO

O estágio curricular desenvolveu-se ao longo de três componentes. Durante a primeira quinzena de Setembro de 2012 acompanhei o médico veterinário Dr. Jorge Evangelista, na sua rotina de campo pela região de Aveiro. Foram executadas visitas de controlo reprodutivo nas quais pratiquei a técnica de palpação transretal (PTR) realizando exames ginecológicos e diagnósticos de gestação. Acompanhei também intervenções de clínica geral durante as quais auxiliei na realização de cirurgias do aparelho digestivo.

O período segundo e mais importante componente do estágio teve início na segunda quinzena de Setembro de 2012 e prolongou-se até Junho de 2013. Acompanhei a actividade profissional do meu orientador, Doutor João Nestor das Chagas e Silva, nas suas saídas de campo, tanto do âmbito escolar como da sua prática clínica privada. Enquanto acompanhava a actividade profissional do meu orientador, tive a oportunidade de seguir o programa de transferência de embriões (TE) em bovinos leiteiros na Ilha Graciosa, onde assisti à recolha, transferência e congelamento de embriões de raça Holstein Frísia. Além disso, acompanhei também o processo selecção de dadoras e receptoras. Assisti a visitas de rotina de controlo reprodutivo onde tive a oportunidade de adquirir treino em, diagnósticos de gestação por palpação transretal por volta dos 50 dias de gestação e na avaliação da involução uterina por volta dos 35 dias pós-parto. Colaborei também em saídas de campo onde acompanhei exames andrológicos, de touros de raças Charolesa, Blonde d'Aquitaine e Limousine. Tive a oportunidade de auxiliar em programas de ovulação múltipla e transferência de embriões (OMTE) numa exploração de produção extensiva de bovinos de carne onde colaborei na recolha e transferência de embriões de raça Salers (Figura 1). Em bovinos de leite, acompanhei vários protocolos de superovulação e transferência de embriões, tanto na zona de Aveiro, como em explorações na zona da Moita. Durante o meu período de estágio, o meu orientador deu-me formação na área de ultrassonografia reprodutiva bovina e de lavagem uterina para recolha de embriões, treino esse que decorreu nos estábulos da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV). Ainda no âmbito de ultrassonografia bovina acompanhei dois *workshops* leccionados pelo meu orientador, organizados pela Associação de Estudantes da FMV nos estábulos da mesma e nas instalações da Estação Zootécnica Nacional. Acompanhei um curso de inseminação artificial (IA) para técnicos de inseminação artificial em bovinos, organizado pela Secção de Reprodução e Obstetrícia da FMV, onde aprendi a técnica de inseminação artificial.

Na terceira componente do estágio, permaneci a tempo inteiro na Casa Agrícola Policarpo (Cabeço Verde, Moita), de Outubro de 2012 a Junho de 2013, onde desenvolvi o trabalho experimental a partir do qual redigi a minha dissertação de mestrado e, onde pude acompanhar as rotinas do trabalho diário numa exploração de produção intensiva de bovinos leiteiros.



A minha presença na exploração permitiu-me acompanhar o aparo correctivo das unhas, secagem de vacas por proximidade do parto ou por incapacidade do tratamento de determinadas mamites.

Participei na realização de alguns partos e na administração de colostro aos vitelos, assisti a cirurgias, por exemplo, cesarianas e resolução de deslocamento do abomaso. Acompanhei o diagnóstico e tratamento de patologia respiratória tanto em bovinos adultos como em vitelos. Prestei ainda colaboração na rotina de ordenha e acompanhei a visita da veterinária responsável pela qualidade do leite, assim como, duas visitas do Agrupamento de Defesa Sanitária (ADS) durante as quais participei no controlo sanitário dos animais. Na área de reprodução bovina, participei na detecção deaios, no tratamento intra-uterino de metrites e na prática de inseminação artificial. No âmbito do estudo que deu origem á minha dissertação de mestrado realizei ecografias do aparelho reprodutivo e participei na sincronização de vacas para inseminação em tempo fixo.

Figura 1. Processamento e visualização de embriões à lupa.  
Original do autor.

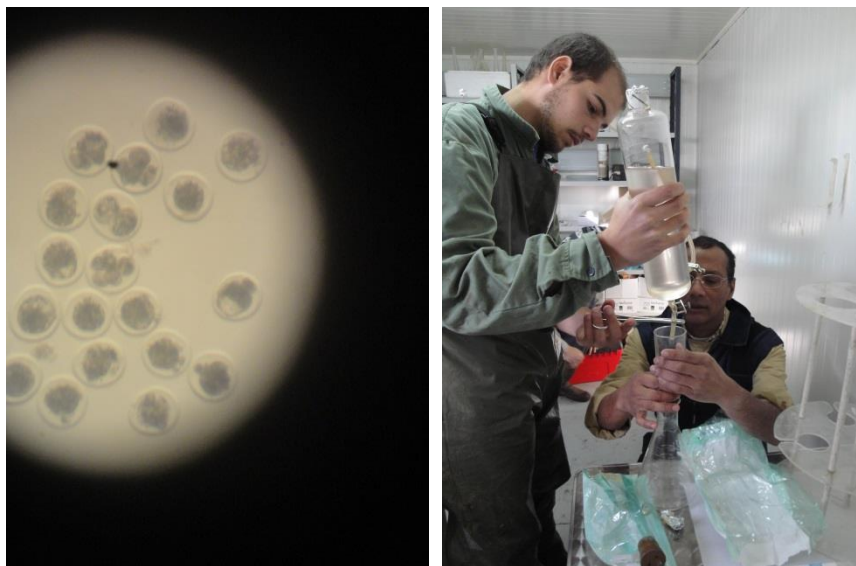


Tabela 1. Resumo de actividades realizadas no estágio.

Área de intervenção	Actividades		Realizado	Observado	
Reprodução Bovina	Exame ginecológico		PTR	700	1500
	DG		PTR	30	500
	Exame ginecológico		Ecografia	150	200
	DG		Ecografia	40	80
	Patologias Reprodutivas	Quistos ovários	PTR	15	20
		Utero Unicórnio	PTR	1	
		Endometrites	PTR	30	50
	Colocação de dispositivos intravaginais de progesterona (P <sub>4</sub> )			1	1
	Colocação de comprimidos intra-uterinos			7	10
	Tratamento AB intra-uterino			15	42
	IA (DGs positivos)			18(9)	215
	Lavagem Uterina para TE			2	12
	TE				75
	Sincronização de fêmeas para IATF			30	80
Exame andrológico				13	
Cirurgia	Resolução de hérnia umbilical			1	2
	Deslocamento de abomaso				2
	Cesariana				2
Outros	Recolha de amostras de sangue			20	200

## **1 GENERALIDADES SOBRE ULTRASSONOGRAFIA**

## 1.1 NOTA HISTÓRICA

No início a ultrassonografia tinha uma utilização mais terapêutica do que diagnóstica sendo utilizada numa série de doenças. Nessa altura, acreditava-se ser a solução para qualquer condição (Quintela, Pablo, Herradón, Martinez & González, 2006).

Os primeiros sistemas de ecografia eram compostos por um tanque com água dentro do qual o paciente era colocado, o que tornava muito difícil o processo (Nautrup, 2000; Quintela *et al.*, 2006). No entanto, com os avanços tecnológicos e desenvolvimento de novos transdutores facilitou-se o trabalho com colocação directa daqueles sobre a região do paciente a explorar (Nautrup, 2000; Quintela *et al.*, 2006).

Foi no início dos anos 40 que a ecografia foi utilizada de modo experimental como ferramenta de diagnóstico pelo neuropsiquiatra austríaco Kart Theodore Dussik, sendo que esta técnica já oferecia imagens bidimensionais (Nautrup, 2000; Quintela *et al.*, 2006).

No início dos anos 50, Edler e Hertz fizeram a primeira descrição do modo M e da sua utilização em ecocardiografia (Schäberle, 2005).

Em 1953, já se podiam observar imagens em modo B de tumores e, em 1955, Wild e Reid descobriram o uso do modo A com transdutores transvaginais e transretais (Quintela *et al.*, 2006).

Um dos pioneiros na utilização da ecografia no diagnóstico ginecológico e obstétrico foi Ian Donald em 1958 (Nautrup, 2000).

O primeiro ecógrafo a trabalhar em tempo real foi desenvolvido nos anos 60 por Krause e Soldner (Schäberle, 2005)

No campo da medicina veterinária, a utilização da ultrassonografia apoiou-se na sua utilização em medicina humana. Uma das principais aplicações desta técnica é na área da reprodução, onde o diagnóstico ecográfico tem uma história relativamente curta (Quintela *et al.*, 2006).

Os primeiros estudos apareceram em 1966 quando Indahl realizou diagnósticos de gestação em ovinos por via transabdominal, utilizando o modo A (Nautrup, 2000).

Tainturier, em 1983, introduziu a ecografia no controlo reprodutivo em gado bovino e foi nos anos 80 que se registou um grande avanço na compreensão da fisiologia reprodutiva dos bovinos, bem como da patologia uterina, por Pierson e Ginther em 1987. Estes autores foram responsáveis pela compreensão da dinâmica folicular, em 1988. Neste mesmo ano, Kastelic e colaboradores utilizaram a ecografia para monitorizar o desenvolvimento embrionário-fetal. Em 1989, Curran e colaboradores determinaram o sexo fetal e Kastelic e colaboradores publicaram um artigo sobre diagnóstico de gestação precoce (Quintela *et al.*, 2006).

## 1.2 PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ULTRASSONOGRAFIA

### 1.2.1 Propriedades físicas dos ultra-sons (US)

O ouvido humano detecta sons entre as frequências de 20 Hertz (Hz) até 20.000 Hz, sendo que o limite superior diminui com a idade. Sons com frequências abaixo e acima destes valores são designados de infra-sons e ultra-sons, respectivamente (Williams, 2012). As frequências mais utilizadas em veterinária encontram-se entre  $2 \times 10^6$  e  $10 \times 10^6$  (2 a 10 MHz). Com os avanços tecnológicos, têm sido utilizados ultra-sons de frequências mais elevadas para fins de diagnóstico e, em alguns locais, frequências iguais ou superiores a 15 MHz têm sido usadas em trabalhos de alta resolução (Mannion, 2006).

A emissão e recepção de ultra-sons era tremendamente complicada, uma vez que eram necessários complexos mecanismos para a produção dos mesmos. Este inconveniente foi ultrapassado quando se descobriu que certos materiais (quartzo, turmalina, etc.) quando lhes era aplicada energia mecânica produziam cargas eléctricas. Este facto foi denominado de efeito piezoeléctrico (Quintela *et al.*, 2006).

Uma onda sonora pode ser descrita pelas suas várias componentes: velocidade ( $v$ ), intensidade, comprimento de onda ( $\lambda$ ) e frequência ( $f$ ) (Gayrard, Carrière & DesCôteaux, 2010) (Figura 2).

A velocidade de uma onda é a rapidez da variação de pressão no meio, e depende somente das características do meio, elasticidade e densidade (Schäberle, 2005; Aldrich, 2007). Em tecidos corporais, a velocidade média de propagação é aproximadamente 1540 metros (m) /segundo (s), com as excepções do tecido ósseo (4080m/s) e tecido pulmonar (600m/s, graças à presença de ar). Isto significa que uma onda de ultra-sons percorre 1,5 milímetros (mm) em  $10^{-6}$ s (Gayrard *et al.*, 2010).

A intensidade de um ultra-som é determinada pela amplitude da onda que corresponde à amplitude do movimento das partículas (Gayrard *et al.*, 2010). Intensidade define-se como o fluxo de energia que atravessa uma unidade de área por unidade de tempo e é expressa em watts (W) por centímetros (cm)<sup>2</sup> (W/cm<sup>2</sup>) (Williams, 2012).

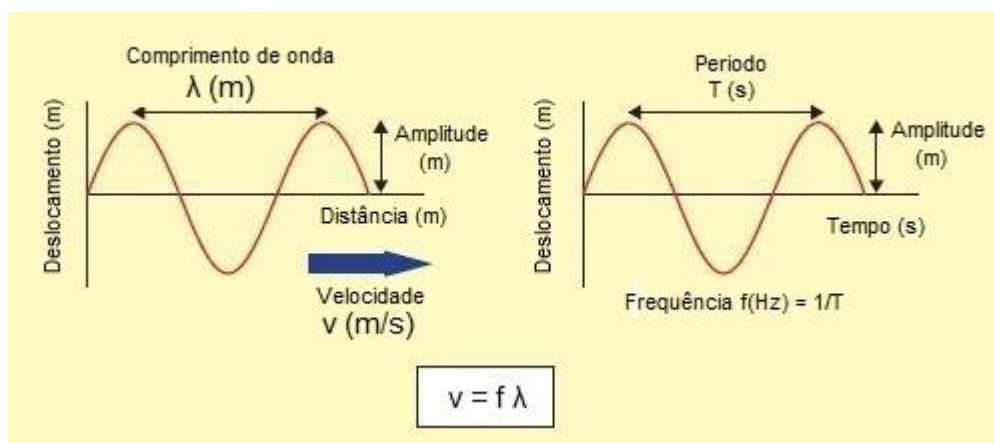
Frequência expressa o número de vibrações da fonte de ultra-sons por unidade de tempo (Aldrich, 2007). Assim, a frequência é semelhante ao número de ondas que passa num determinado ponto no meio por segundo e ao número de vezes que a partícula vibra por segundo. A unidade de frequência é o hertz (Hz) (Gayrard *et al.*, 2010) (Figura 2).

O comprimento de onda ( $\lambda$ ), que é caracterizado tanto pela onda como pelo meio que atravessa, caracteriza a extensão espacial de um ciclo de vibração. Relaciona-se com a frequência ( $f$ ) e com a velocidade ( $v$ ) pela equação:  $v = f \lambda$  (Figura 2).

Assim, o comprimento de onda num meio aquoso (velocidade = 1540m/s) a uma frequência de 5 milhões de Hz (5MHz) é 0,3 mm. O comprimento de onda tem uma grande importância no diagnóstico, uma vez que determina as resoluções axial e lateral que são

respectivamente, 2 a 4 vezes e 3 a 10 vezes, o comprimento de onda. Portanto, no exemplo anterior, as resoluções axial e lateral estariam respectivamente entre 0,6 e 1,2 mm, e 0,9 e 3 mm dependendo da qualidade do aparelho (Gayard *et al.*, 2010). Quanto maior a frequência, menor será o comprimento de onda e melhores serão as resoluções axial e lateral. Contudo, uma vez que maiores frequências sofrem maior atenuação, à medida que se deseja explorar estruturas mais profundas, é necessário utilizar frequências menores (Schäberle, 2005).

Figura 2. Características da onda sonora. Adaptado de Williams (2012).



### 1.2.2 Formação dos ultra-sons

O processo inicia-se pela emissão de ultra-sons por parte do cristal piezoelétrico presente no interior do transdutor. Isto ocorre graças ao efeito piezoelétrico de alguns cristais. Estes deformam-se ao ser-lhes aplicada voltagem ou diferença de potencial tal, que vibram e produzem ultra-sons. A frequência da produção dos ultra-sons depende do tempo que os ecos demoram a retornar dos tecidos ao transdutor, uma vez que só quando os ecos são recebidos é que se pode enviar outro pulso. Deste modo, para estruturas mais superficiais podem usar-se frequências superiores, enquanto que em estruturas mais profundas é necessário a utilização de frequências mais baixas. Quando o cristal produz ultra-sons, estes são emitidos em todas as direcções, mas apenas a porção direccionada para os tecidos permite a formação de imagem. Por isso, o transdutor encontra-se envolvido por uma estrutura que apenas deixa passar os ultra-sons através da face virada para o paciente. Esta face não pode reflectir ou bloquear os ultra-sons de nenhum modo e é por isso fabricada com materiais especiais para o efeito (Mannion, 2006).

### 1.2.3 Como se formam os ecos

Os ultra-sons atravessam os tecidos até encontrarem uma interface, onde uma percentagem dos ultra-sons emitidos são reflectidos de volta para o transdutor (Williams, 2012).

Cada tecido tem a sua impedância acústica própria, que consiste na resistência que este oferece à transmissão da onda sonora (Mannion, 2006). A impedância acústica ( $z$ ) de um tecido é o produto da densidade ( $\rho$ ) do meio e a velocidade da onda ( $v$ ):  $z = \rho v$  (Gayrard *et al.*, 2010).

A impedância acústica de cada tecido é, por si só, importante, mas a diferença de impedâncias acústicas entre tecidos adjacentes é, especialmente importante (Mannion, 2006). Quando há uma grande diferença de impedância acústica entre tecidos adjacentes haverá uma maior reflexão das ondas sonoras por parte da interface. Por outro lado, se a diferença de impedância acústica for pequena, apenas uma pequena porção dos ultra-sons será reflectida (Herbener, 1996; Aldrich, 2007). Uma interface entre tecidos moles e tecido ósseo origina uma reflexão de quase 50% da onda, enquanto, numa interface entre tecidos moles e ar a reflexão é de quase 99% (Mannion, 2006; Aldrich, 2007).

Por isto, é necessária a presença de gel entre a sonda e a pele ou entre a sonda e a mucosa, de maneira a minorar a presença de ar entre as duas superfícies e, assim, reduzir a diferença de impedância acústica destas interfaces, evitando deste modo que os ultra-sons sejam fortemente reflectidos (Herbener, 1996).

Onda reflectida ou eco, é um conceito crítico em diagnóstico ecográfico (Aldrich, 2007). Um eco regressa ao cristal piezoeléctrico onde produz uma corrente em resposta à recepção do eco. O atraso temporal entre a emissão e recepção do eco permite determinar a distância entre os cristais e a interface (Gayrard *et al.*, 2010).

### 1.2.4. Atenuação dos ultra-sons

A energia dos ultra-sons é atenuada durante a propagação através dos tecidos. Atenuação corresponde ao decréscimo em intensidade da onda à medida que ela progride pelos tecidos e é expressa em decibéis (dB) /cm (Williams, 2012). Os mecanismos de atenuação são as interacções durante as quais energia é removida da onda incidente, tanto por ser reemitida em diferentes direcções (reflexão, refacção e difusão), em que a reflexão é a única responsável pelas ondas que regressam à sonda para uma correcta produção da imagem, como absorvida pelos tecidos sendo transformada em calor (Gayrard *et al.*, 2010). Quanto maior a frequência de um ultra-som maior será a atenuação a que é sujeita (Aldrich, 2007).

#### 1.2.4.1 Refracção dos ultra-sons

A refacção consiste na alteração de direcção das ondas sonoras ao passarem de um meio para outro, cujas velocidades de propagação sejam diferentes e, apenas ocorre, se as ondas sonoras incidentes se encontrem num plano oblíquo em relação à interface. Normalmente, isto ocorre quando há uma vesícula preenchida por líquido dentro de uma estrutura mais sólida (vesícula embrionária, folículo, etc.). Uma vez que as ondas sofrem refacção, elas irão assumir uma direcção ligeiramente diferente, levando a que o ângulo da sua reflexão seja também diferente. Isto origina diferenças entre a posição da imagem e da estrutura real originando artefactos (Mannion, 2006).

#### 1.2.4.2 Difusão dos ultra-sons

A difusão é o resultado do reflexo de uma pequena porção da energia da onda de ultra-sons em várias direcções causado por objectos mais pequenos que o comprimento de onda (Gayrard *et al.*, 2010).

#### 1.2.4.3 Absorção dos ultra-sons

A absorção resulta da transformação de energia sonora em calor, quando a onda se propaga num meio homogéneo. Assim, a intensidade do ultra-som diminui exponencialmente à medida que penetra num tecido. A absorção depende do tipo de tecido e é muito baixa em líquidos e muito elevada em tecido ósseo ou ar (Gayrard *et al.*, 2010).

O coeficiente de atenuação dos tecidos moles que tem em conta, tanto a absorção como a difusão, é proporcional à frequência e tem um valor médio de 0.5 dB por MHz e por cm. Desta maneira, para condições de atenuação idênticas, a capacidade de penetração dos ultra-sons diminui à medida que se aumenta a frequência. Consequentemente, aumentos na frequência reduzem a capacidade de penetração dos ultra-sons (Gayrard *et al.*, 2010).

### 1.3. COMPOSIÇÃO E FUNCIONAMENTO DO ECÓGRAFO

Para se criar uma imagem a partir dos ultra-sons utiliza-se um aparelho denominado de ecógrafo. Há uma grande variedade de equipamentos, todos eles possuindo um conjunto de componentes que é forçosamente comum.

Dentro do transdutor, um cristal piezoeléctrico produz ultra-sons a partir da energia eléctrica e converte, novamente, os ecos resultantes em energia eléctrica (Mannion, 2006). Após a emissão dos ultra-sons, o transdutor tem de esperar pelos respectivos ecos antes de emitir novos ultra-sons. Como resultado, o transdutor transmite ultra-sons 1% do tempo e nos restantes 99% “escuta” os ecos resultantes (Williams, 2012). O intervalo de tempo entre a



emissão e a recepção dos respectivos ecos define a distância entre o transdutor e o tecido reflector (Schäberle, 2005).

O transmissor regula o envio de ultra-sons por parte do transdutor, controlando a duração e intensidade dos pulsos ultra-sónicos, uma vez que estes dependem da voltagem aplicada ao transdutor (Quintela *et al.*, 2006).

O receptor é o componente para onde se dirigem os impulsos eléctricos gerados no transdutor em resposta aos ecos originados nos tecidos. Como estes ecos, por vezes, são de baixa intensidade, há a necessidade de os amplificar antes de os converter em imagem e, para isso, são dirigidos ao amplificador (Quintela *et al.*, 2006).

Por fim, há dois tipos de equipamentos, os que possuem um osciloscópio analógico para converter o sinal eléctrico numa imagem e, os mais utilizados actualmente, que convertem o sinal analógico em digital, previamente ao seu envio para um ecrã, onde será exibida essa mesma imagem. Estes últimos, desde os anos 90, têm vindo a substituir os osciloscópios analógicos (Quintela *et al.*, 2006; Gayrard *et al.*, 2010).

Uma parte fundamental de qualquer ecógrafo é o painel de controlo. Este varia muito de modelo para modelo mas todos apresentam os mesmos controlos básicos. De um modo geral, todos têm um controlo de intensidade, controlo ganho/diminuição, compensação temporal de ganho, capacidade de fazer variar o ângulo sectorial, capacidade de variar a taxa de actualização de imagem (Mannion, 2006).

Ao aumentar-se a intensidade, uma maior diferença de potencial será aplicada ao cristal originando um ultra-som com maior intensidade, obtendo-se deste modo, uma imagem com mais brilho (Mannion, 2006).

Ganho é o grau de amplificação que é aplicada aos ecos uma vez que estes são demasiado fracos para originar uma imagem perceptível. Este controlo aumenta a amplificação de todos os ecos. Apesar de ter o mesmo efeito que o controlo da intensidade, não é a mesma coisa. Ambos os controlos, intensidade e ganho, fazem variar o brilho da imagem como um todo, contudo ao variar a intensidade vai-se alterar a intensidade dos ultra-sons que incidem no paciente e ao variar o ganho vai-se variar o grau de amplificação a que os ecos são sujeitos. Quando uma imagem se encontra demasiado escura, deve privilegiar-se o aumento do ganho ao invés do aumento da intensidade, de modo a respeitar o princípio da utilização de uma intensidade tão baixa quanto possível. Inversamente, a função de diminuição serve para rejeitar os ecos mais fracos que em princípio não são úteis para a formação da imagem ecográfica. Este controlo deve ser usado com precaução, uma vez que pode levar à perda de detalhes importantes na imagem (Mannion, 2006).

No modo B de ecografia, a profundidade de uma estrutura é estimada a partir do tempo que os ecos demoram a ser detectados. Uma vez que a atenuação aumenta com a profundidade de onde os ecos são originários e consequentemente com o tempo que os ecos demoram a ser detectados, uma ampliação progressivamente maior dos ecos ao longo do tempo vai

fazer com que os provenientes de estruturas mais profundas sofram uma ampliação maior e, deste modo, originem uma imagem com um brilho mais homogêneo entre estruturas superficiais e mais profundas. Esta função é designada de compensação temporal do ganho (Schäberle, 2005).

O ângulo sectorial pode ser alterado na maioria dos equipamentos. Para obtenção de grandes planos utiliza-se um ângulo maior. Já para trabalhos de maior detalhe, em que é necessária alta resolução, este ângulo deve ser menor, de modo a permitir uma maior taxa de actualização da imagem (Mannion, 2006).

A taxa de actualização de imagem é a frequência com que a imagem exibida no monitor é actualizada. Ela vai depender da profundidade e do ângulo sectorial com que se trabalha. Para imagens mais superficiais e ângulos mais estreitos, pode ser maior (Mannion, 2006).

A imagem ecográfica pode, depois, ser trabalhada de maneira a retirar o maior valor diagnóstico possível da mesma. Pode ampliar-se a imagem apenas nas áreas de interesse, congelar a mesma de maneira a poder fazer medições e até dividir o ecrã de maneira a poder comparar imagens (Mannion, 2006).

#### 1.4 TIPOS DE SONDA

Sonda ou transdutor, tem como principal constituinte os cristais com propriedades piezoeléctricas (quartzo, certos tipos de cerâmica). Os cristais dilatam e contraem quando lhes é aplicada corrente eléctrica, com uma frequência inerente ao tipo de cristais que compõem a sonda e aquela, não pode ser alterada pelos controlos do ecógrafo (Mannion, 2006).

Algumas sondas são capazes de trabalhar com multifrequências. Os avanços na tecnologia permitem actualmente trabalhar simultaneamente com ondas com diferentes frequências para o campo próximo ou distante, permitindo uma resolução máxima para uma determinada profundidade de imagem sem ter de trocar de sonda (Nyland, Mattoon, Herrgesell & Wisner, 2002). As sondas são classificadas de acordo com o formato do campo visual que produzem e consoante o modo de funcionamento é mecânico ou electrónico (Mannion, 2006) (Figura 3).

As sondas mecânicas contêm 2 a 4 cristais, num aro giratório. Os cristais à medida que passam pela janela de visualização, produzem uma imagem em forma de fatia de tarte, também chamada de sectorial. Uma vez que as sondas mecânicas têm partes em movimento, estas produzem uma imagem menos precisa e têm maiores probabilidades de ter algum tipo de avaria (Schäberle, 2005; Mannion, 2006).

As sondas electrónicas possuem uma matriz de cristais que são estimulados de modo electrónico para produzir a imagem. As sondas electrónicas de matriz linear têm um grande número de cristais rectangulares organizados de modo a fazer uma linha. Grupos destes cristais são sequencialmente estimulados, intermitentemente, de modo a produzir a imagem

ecográfica (Schäberle, 2005; Mannion, 2006). A maioria das sondas electrónicas lineares possui algum tipo de concavidade ou outro tipo de indicador, para o operador saber se a posição em que a sonda se encontra dentro do recto é a mais indicada para obtenção de uma imagem de qualidade (Gayrard *et al.*, 2010).

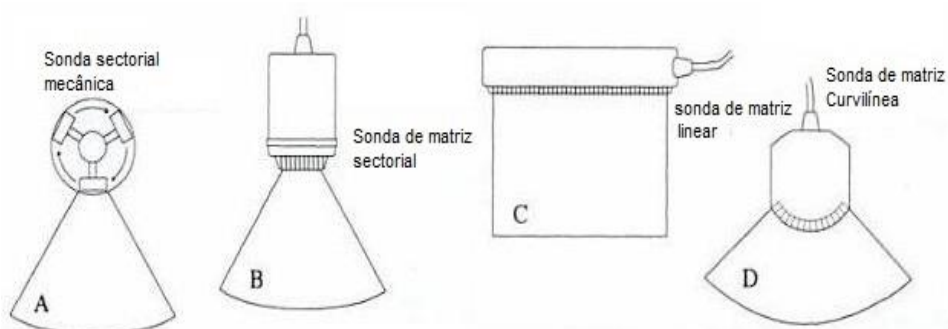
Pode haver até 250 cristais numa sonda, que são estimulados em grupos de 20 de cada vez. Após cada grupo emitir as suas ondas e receber os respectivos ecos passa-se ao próximo grupo. Este processo é contínuo até ao fim da matriz e depois recomeça. Percorrer toda a matriz demora cerca de 1/30 segundo. Isto acontece repetidamente e a imagem no ecrã é actualizada sempre que um ciclo é completo. A vantagem da sonda linear é que possui um grande campo visual, com boa definição em tecidos próximos dela (Mannion, 2006).

Tanto as sondas electrónicas curvilíneas como as electrónicas sectoriais produzem uma imagem em forma de fatia de tarte (Schäberle, 2005; Mannion, 2006) (Figura 3).

As sondas electrónicas curvilíneas são, na realidade, uma adaptação das sondas lineares. Na verdade, são bastantes semelhantes, mas a diferença é que nestas, a matriz de cristais assenta numa superfície convexa e os ultra-sons emitidos não são paralelos. Em comparação com sondas sectoriais, as curvilíneas apresentam uma superfície de contacto muito maior, mas uma vez que os ultra-sons emitidos são perpendiculares à sonda, isto torna-a melhor para utilização transretal (Mannion, 2006).

A matriz das sondas electrónicas sectoriais é composta por um número inferior de cristais, quando comparadas com as lineares, aproximadamente 128. Uma das vantagens das sondas sectoriais em comparação com as restantes é que necessitam de uma superfície de contacto inferior e isso permite, por exemplo, o acesso intercostal apropriado para ecocardiografia (Schäberle, 2005; Mannion, 2006). O tamanho da superfície de contacto é muitas vezes um critério importante na selecção de sondas em medicina veterinária, visto que, muitas vezes, os pacientes são de dimensões bastante pequenas, o que impossibilita a utilização de sondas com grandes superfícies de contacto (Mannion, 2006).

Figura 3. Tipos de sondas ultrassonográficas. Adaptado de Nyland *et al.* (2002).



## 1.5 PODER DE RESOLUÇÃO

À medida que um feixe de ultra-sons passa do transdutor para os tecidos, vai divergindo. Ao divergir, a resolução da imagem diminui (Mannion, 2006). A resolução é a capacidade de diferenciação espacial de duas estruturas com impedâncias acústicas diferentes. A sua distinção é feita em dois eixos, resolução axial e resolução lateral, na direcção da propagação dos ultra-sons ou, perpendicularmente a esta, respectivamente (Schäberle, 2005) (Figura 4).

### 1.5.1 Resolução axial

A resolução axial é a capacidade de diferenciar duas estruturas ao longo do feixe de ultra-sons (Figura 4A). Quanto melhor for resolução axial, melhores serão a qualidade e o detalhe da imagem. A frequência utilizada é fundamental uma vez que quando se usa um menor comprimento de onda melhor será a resolução axial e para uma frequência maior têm-se um comprimento de onda menor (Mannion, 2006).

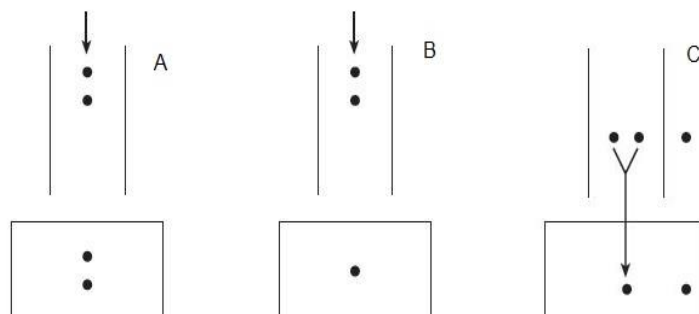
### 1.5.2 Resolução lateral

A resolução lateral consiste na capacidade em diferenciar duas estruturas, lado a lado, na imagem (Schäberle, 2005) (Figura 4C). Esta diferenciação pode tornar-se difícil, uma vez que os ecos provenientes de cada uma das estruturas podem confundir-se e formar um só eco e o equipamento, vai interpretá-los como sendo provenientes de uma única estrutura (Williams, 2012). Por outras palavras, quando a distância entre duas estruturas é maior que a largura do feixe de ultra-sons estas vão ser representadas como duas estruturas separadas; se a distância entre elas for inferior à largura do feixe, serão visualizadas como sendo uma única estrutura. Os transdutores de alta frequência, por terem um campo próximo maior, em que o feixe de ultra-sons é mais estreito, vão consequentemente, ter melhor resolução lateral (Mannion, 2006). Uma vez que a resolução lateral depende da largura do feixe de ultra-sons é melhor, tanto quanto a profundidade das estruturas a visualizar permitir, trabalhar com transdutores de alta frequência ou trabalhar dentro da zona focal do transdutor (Herbener, 1996; Mannion, 2006).

É apenas numa certa zona, a zona focal, que o feixe de ultra-sons proporciona uma alta resolução, enquanto que fora desta, a resolução é bastante pior (Schäberle, 2005). A zona focal corresponde à área uns cms proximal e distalmente ao ponto focal, onde o feixe é mais estreito, zona de Fresnel. Para além desta zona, os ultra-sons começam a divergir e entra-se na zona de Fraunhofer onde a resolução lateral é significativamente pior (Williams, 2012). As distâncias focais das sondas usadas para ecografia transrectal são 7, 3.5 e 2 cm, para as frequências respectivas de 3,5, 5 e 7,5 MHz. Podem obter-se imagens de qualidade até duas vezes a distância focal. Deve ter-se em conta que, em sondas que permitem ter

múltiplos pontos focais, ao defini-los vai diminuir-se a taxa de actualização de imagem (Gayrard *et al.*, 2010).

Figura 4. Esquema dos diferentes tipos de resolução. Adaptado de Mannion (2006).



Legenda. A: Duas estruturas distinguíveis ao longo do feixe (resolução axial); B: Duas estruturas indistinguíveis ao longo do feixe (resolução axial); C: Estruturas lado a lado perpendiculares ao feixe, duas são indistinguíveis e a terceira é distinguível das restantes duas (resolução lateral).

## 1.6 MODOS DE APRESENTAÇÃO DE IMAGEM

### 1.6.1 Modo A

O modo A, de amplitude, actualmente é o menos utilizado. Contudo continua a ter alguma importância em oftalmologia e em outras aplicações que necessitem de uma maior exactidão na medição de distâncias (Nyland *et al.*, 2002). Este modo é o mais simples e antigo dos três. A origem e amplitude dos ecos são exibidas sob a forma de picos originários de uma linha de referência. A amplitude dos ecos é representada pelo tamanho dos picos e, a posição destes na linha de referência, representa a distância entre a estrutura que originou esses ecos e o transdutor (Schäberle, 2005). Em equipamentos dedicados só ao modo A é comum a linha de referência aparecer na horizontal com o transdutor para a esquerda, ou seja, à medida que se progride para a direita na linha vai aumentando a profundidade das estruturas examinadas (Nyland *et al.*, 2002).

### 1.6.2. Modo B

No modo B, de brilho, os ecos são revelados graficamente como pontos cujo brilho é representado numa escala de cinzentos. A maioria dos equipamentos modernos trabalha com 256 tons de cinzento. O tom de cada pixel é proporcional à amplitude dos ecos detectados, em que o preto é o mínimo e o branco o máximo (Schäberle, 2005). Estes pontos aparecem ao longo de um eixo cuja posição representa a profundidade a que as

estruturas se encontram. No modo B, o transdutor encontra-se normalmente no topo da imagem e a profundidade aumenta à medida que se vai descendo (Nyland *et al.*, 2002).

#### 1.6.2.1 Modo B em tempo real

Os equipamentos de modo B em tempo real exibem como que a imagem de um corte histológico em escala de cinzentos. Isto consegue-se com um feixe de ultra-sons composto por uma série de linhas de modo B que quando direccionado para os tecidos fornece uma imagem bidimensional. Os ecos recebidos para cada linha originam uma imagem que fica no ecrã até que um novo ultra-som seja emitido e seu eco recebido para essa linha (Nyland *et al.*, 2002).

#### 1.6.3 Modo M

O modo M ou TM, de movimento ou tempo-movimento, tem como principal aplicação a ecocardiografia. No modo M, regista-se a profundidade num eixo vertical e o tempo no eixo horizontal. A imagem é semelhante à do modo B, com a mesma escala de cinzentos, proporcional à amplitude dos ecos. Porém, há um registo temporal da progressão das estruturas o que permite avaliar o seu movimento, que é normalmente registado num monitor ou impresso em papel. Este registo dos movimentos é bastante útil para as medições de cavidades e paredes cardíacas, assim como a função valvular (Nyland *et al.*, 2002; Schäberle, 2005).

### 1.7 ARTEFACTOS

Artefactos são imagens que aparecem no monitor que não correspondem a ecos gerados por estruturas reais. É fundamental conhecê-los, uma vez que podem aparecer em 30 a 90% dos exames ecográficos e são a causa mais frequente de erros de diagnóstico (Hand *et al.*, 1997 citados por Quintela *et al.*, 2006).

O uso inadequado do equipamento, principalmente a nível dos controlos, má técnica ou preparação inadequada do paciente podem afectar a qualidade e interpretação da imagem ecográfica (Lang, 2006a).

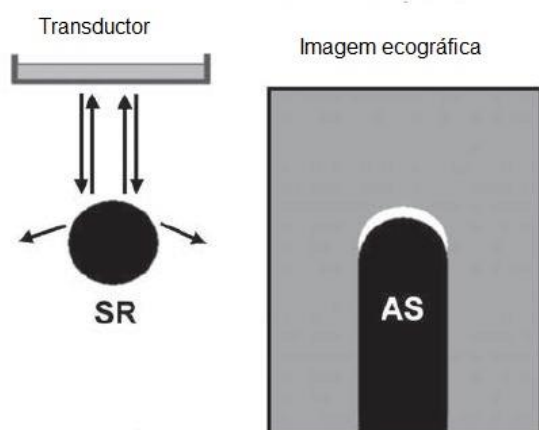
Artefactos são frequentemente observados em ecografia reprodutiva de bovinos, o que se deve à grande quantidade de estruturas com líquido no seu interior e à presença de ar no recto dos animais (Gayrard *et al.*, 2010).

### Sombra acústica

Numa imagem normal, uma zona anecogénica, de cor preta, corresponde à ausência de uma estrutura reflectora, como é o caso de uma estrutura preenchida por líquido. Mas nem sempre as áreas que aparecem pretas na imagem ecográfica correspondem à ausência de estruturas reflectoras, podendo representar um artefacto (Gayrard *et al.*, 2010).

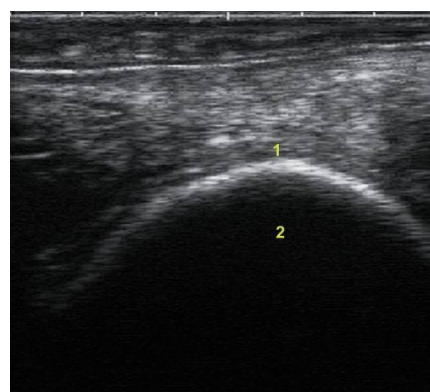
A sombra acústica é pois um artefacto produzido por estruturas com ar ou osso que reflectem ou absorvem praticamente 100% do feixe de ultra-sons. Isto tem como consequência a ausência de ecos originários das suas regiões distais, resultando numa imagem em que há uma zona hiperecogénica correspondente a essa estrutura seguida de uma zona anecogénica de onde não são recebidos ecos (Lang, 2006b) (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Esquema da formação do artefacto de sombra acústica. Adaptado de Lang (2006b).



Legenda. SR: superfície fortemente reflectora; AS: zona de sombra acústica.

Figura 6. Imagem ultrassonográfica de sombra acústica. Adaptado de Gayrard *et al.* (2010).



Legenda. 1: Superfície fortemente reflectora (osso pélvico); 2: zona de sombra acústica.

### Sombra acústica lateral

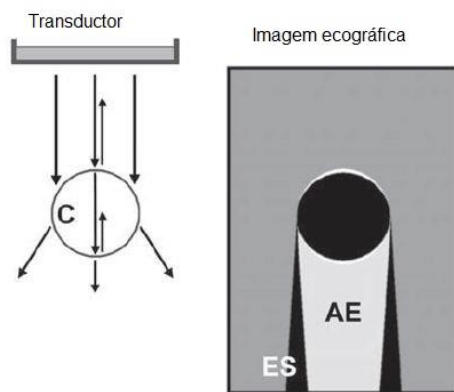
Este artefacto corresponde a um tipo especial de sombra acústica e é produzido nas margens laterais de estruturas de perfil esférico preenchidas por líquido, por exemplo folículos. Este artefacto tem origem na refração do feixe de ultra-sons quando este encontra uma interface tecidos moles/líquido, principalmente devido à diferença de velocidade de propagação dos ultra-sons nestes dois meios e, aos bordos arredondados da estrutura, que actuam como uma lente (Lang, 2006b) (Figuras 7 e 8).

### Reforço acústico posterior

A energia do feixe de ultra-sons é atenuada à medida que penetra nos tecidos. Quando atravessa uma estrutura com fraca atenuação, o feixe vai perder menos energia relativamente ao que acontece com as estruturas adjacentes com índice maior de

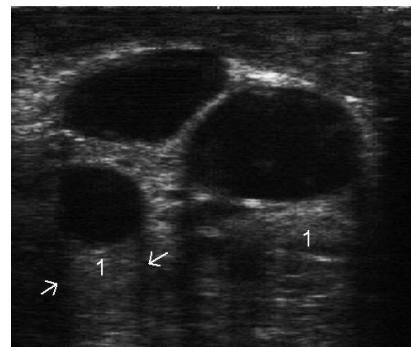
atenuação. Isto resulta em ecos de maior magnitude originários das estruturas distais à zona de menor atenuação, em comparação com os restantes tecidos, para a mesma profundidade. Ou seja, na imagem vai surgir uma zona com fraca atenuação, de cor preta, seguida por uma zona com maior intensidade de ecos, com um brilho superior às estruturas adjacentes na mesma profundidade (Figuras 7 e 8). Este fenómeno ocorre principalmente com estruturas quísticas preenchidas por líquido, ou por exemplo, um corte transversal de um útero gravido (Lang, 2006b).

Figura 7. Esquema da formação dos artefactos de reforço acústico posterior e de sombra lateral. Adaptado de Lang (2006b).



Legenda. AE: reforço acústico posterior; ES: sombra lateral.

Figura 8. Imagem ultrassonográfica de ovário com folículos apresentando artefactos de reforço acústico posterior e sombra lateral. Adaptado de Gayrard *et al.* (2010).



Legenda. 1: reforço acústico posterior; Setas: sombra acústica lateral.

### Reflexo especular

Este artefacto ocorre quando o feixe de ultra-sons incide numa superfície lisa maior que a largura do feixe e paralela à sonda. Se a superfície não estiver paralela à sonda, os ecos não vão ser registados, uma vez que serão reflectidos no mesmo ângulo de incidência, não retornando assim à sonda. Deste modo, a amplitude do eco gerado vai depender não só da diferença de impedância acústica entre as duas estruturas que compõem a interface, mas também do ângulo de incidência do feixe. Este tipo de artefacto é muito frequente em ecografia reprodutiva bovina, considerando as várias pregas cervicais e a superfície dos folículos ováricos (Gayrard *et al.*, 2010).

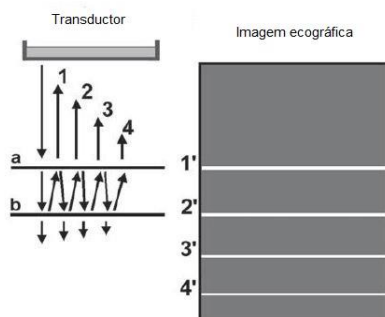
### Reverberação

Na formação deste tipo de artefacto participam duas superfícies altamente reflectoras, sendo que uma delas é normalmente, a interface sonda/pele ou sonda/recto. A segunda superfície reflectora pode ser uma bolsa de ar, uma estrutura óssea ou qualquer outra que seja capaz de reflectir uma grande porção dos ultra-sons. Este artefacto deve-se ao ressalto



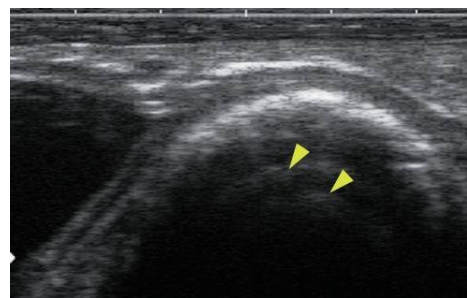
dos ultra-sons entre duas estruturas até que os ecos desapareçam por atenuação. Isto dá origem a vários ecos na imagem em que apenas o primeiro é legítimo tratando-se os outros de reverberações (Gayrard *et al.*, 2010) (Figuras 9 e 10).

Figura 9. Esquema da formação do artefacto de reverberação. Adaptado de Lang (2006b).



Legenda. a e b: superfícies altamente reflectoras; 1',2',3',4': reverberações.

Figura 10 Imagem ultrassonográfica de artefacto de reverberação. Adaptado de Gayrard *et al.* (2010).



Legenda. Setas: reverberações. Originadas pelo ressalto dos ultra-sons entre as interfaces: tecidos moles/osso pélvico e sonda/mucosa rectal.

#### Artefactos causados pela largura do feixe de ultra-sons

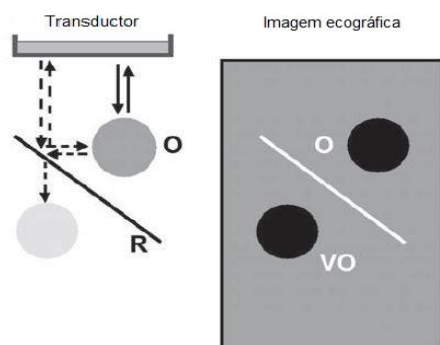
Estes são causados por um problema de resolução lateral e têm origem em feixes de ultra-sons que atingem simultaneamente tecidos moles e líquido. Quando os dois ecos são registados pela sonda ao mesmo tempo, são interpretados como sendo um só. Este tipo de artefacto ocorre quando, por exemplo, um feixe de ultra-sons incide sobre as paredes laterais de uma estrutura preenchida por líquido ou quando esta é menor que a largura do feixe. O resultado é que zonas preenchidas por líquido serão visualizadas em tons de cinzento apesar de serem completamente anecogénicas. Isto pode gerar uma falsa ideia de desorganização da parede e pode conduzir a diagnósticos errados de morte embrionária (Gayrard *et al.*, 2010).

#### Imagem de espelho

Para criar a imagem ecográfica, o equipamento avalia o tempo que os ecos demoram a regressar à sonda e atribui-lhes uma distância consoante a demora, assumindo que os ultra-sons viajaram sempre em linha recta (Lang, 2006b). Na presença de uma interface bastante reflectora, os ultra-sons após serem por ela reflectidos, vão ao encontro das estruturas que se encontram próximas que, por sua vez, reflectem os ecos de novo para a interface que, por último, vai reflectir os ecos de volta ao transdutor. Uma vez que o equipamento assume sempre que os ultra-sons viajam em linha recta, dado o atraso temporal da chegada dos

ecos, este vai colocar duplicados das estruturas na imagem para lá da interface reflectora (Contreras Ortiz, Chiu & Fox, 2012) (Figuras 11 e 12).

Figura 11. Esquema da formação do artefacto de imagem de espelho. Adaptado de Lang (2006b).



Legenda. O: objecto original; VO: duplicado do objecto original; R: interface bastante reflectora

Figura 12. Imagem ultrassonográfica de útero grávido com artefacto de imagem de espelho. Adaptado de Gayrard *et al.* (2010).



Legenda. 1: útero grávido; 2: imagem de espelho.

#### Artefactos de lobos laterais

As imagens ecográficas resultam normalmente dos ecos resultantes do feixe principal. Contudo, se houver estruturas no caminho dos lobos laterais, também estes podem originar ecos (Lang, 2006b). Os lobos laterais são múltiplos feixes de ultra-sons de intensidade reduzida que se encontram fora do feixe principal. Quando uma estrutura fortemente reflectora se encontra no caminho destes feixes vai originar este artefacto (Contreras Ortiz *et al.*, 2012). O equipamento interpreta todos os ecos como sendo resultantes do feixe principal e como tal, os ecos resultantes dos lobos laterais vão originar uma imagem ecográfica que não corresponde a estruturas reais. Para verificar se se trata de um artefacto de lobos laterais deve fazer-se incidir o feixe principal em vários ângulos de modo a detectar se a imagem se mantém fiel à primeira impressão (Lang, 2006b).

### 1.8 SELECÇÃO DO EQUIPAMENTO

A escolha de um ecógrafo deve ser baseada nos objectivos da sua utilização futura (Quintela *et al.*, 2006).

Há uma grande variedade de equipamentos disponíveis desde, unidades hospitalares não móveis, unidades hospitalares móveis que podem ser utilizadas em saídas de campo e, por fim, unidades portáteis para o trabalho do dia-a-dia nas explorações (Gayrard *et al.*, 2010).

De resto, dependendo da aplicação desejada para o equipamento deve escolher-se uma sonda que trabalhe com uma frequência adequada aos propósitos dos exames a realizar. Até ao momento não foram realizadas muitas análises económicas sobre o uso da ultrassonografia nas explorações, contudo o impacto de outras estratégias para detecção precoce de fêmeas não gestantes já foi analisado e concluiu-se que, quanto mais cedo as fêmeas não gestantes são detectadas, maior o retorno económico dessa estratégia. Uma vez que com a ultrassonografia o DG pode ser realizado 7 a 14 dias mais cedo em comparação com a palpação transrectal, as fêmeas não gestantes podem ser identificadas e inseridas num programa que leve à sua inseminação o mais cedo possível, deste modo reduzindo o número de dias em aberto e aumentando a taxa de submissão. Alguns estudos já realizados concluíram que um veterinário que seja assistente em 15 explorações com uma dimensão média de 100 vacas em ordenha pode reaver o investimento feito num ecógrafo ao fim de 3 anos (Fricke, 2002).

## 1.9 TECNOLOGIAS AUXILIARES

### 1.9.1 Doppler

O efeito Doppler foi descrito a primeira vez por Johann Christian Doppler em 1842 (King, 2006).

Este efeito consiste na variação da frequência de uma onda sonora ao fazer-se variar a posição relativa entre o emissor e o receptor dessa onda. Se estes estiverem estacionários a frequência da onda vai-se manter. Mas se um dos dois, o emissor ou o receptor, estiver a aproximar-se um do outro, a frequência vai aumentar e, se algum se estiver a afastar, o contrário também acontece, ou seja, a frequência da onda sonora vai diminuir (Ginther, 1995b).

Na sua utilização médica, o efeito Doppler ocorre normalmente entre a sonda do ecógrafo que se encontra estacionária e os glóbulos vermelhos em movimento nos vasos que actuam como reflectores. Quando estes reflectores se deslocam na direcção da sonda vão causar uma variação positiva na frequência dos ecos recebidos em comparação com a onda emitida. Enquanto que, ao deslocarem-se no sentido inverso, esta variação na frequência será negativa (Lang, 2006b).

Deste modo, com as variações de frequência emitida e recebida, a velocidade e sentido da corrente sanguínea podem ser determinadas (Herzog & Bollwein, 2007).

É de salientar a diferença entre o modo B de ecografia e o Doppler, no que toca ao ângulo ideal de incidência, de maneira a obter a melhor imagem: enquanto no modo B, um ângulo de 90° com uma superfície é aquele que origina ecos de maior intensidade, no modo Doppler um ângulo semelhante não vai produzir informação útil de diagnóstico, uma vez que

os eritrócitos estarão a deslocar-se paralelamente à sonda sem haver variações de distância entre estes (Ginther, 1995b).

No modo Doppler, o ângulo formado entre o feixe de ultra-sons e o vaso sanguíneo deve ser inferior a 60°, de maneira a garantir que os eritrócitos não estejam a deslocar-se perpendicularmente ao feixe de ultra-sons (Schäberle, 2005; Lang, 2006a).

Inicialmente, os ecógrafos de modo Doppler não eram capazes de trabalhar simultaneamente com modo-B, tornando-se necessários equipamentos diferentes para os diferentes modos ecográficos. Contudo, a maioria dos equipamentos modernos combinam o modo-B bidimensional com o Doppler, o que é conhecido como ecografia Duplex (King, 2006).

Actualmente, esta tecnologia em reprodução bovina é maioritariamente utilizada para fins de pesquisa científica, mas através da aquisição de novos conhecimentos pode ser que no futuro ela se torne uma ferramenta útil para os médicos veterinários (Quintela *et al.*, 2012).

#### 1.9.2 Análise computadorizada das imagens ecográficas

A avaliação subjectiva das imagens ecográficas tem sido utilizada ao longo dos anos para definir as alterações a nível de ecogenicidade dos tecidos (Pierson e Ginther, 1988 citados por Davies, Bartlewski, Pierson & Rawlings, 2006). No entanto, a exactidão e a repetibilidade desse processo é questionável (Tom, Pierson, & Adams, 1998) uma vez que o olho humano apenas é capaz de distinguir entre 18 e 20 tons de cinzento (Baxes, 1994 citado por Davies *et al.*, 2006). Para contornar este problema foram desenvolvidos algoritmos que permitem fazer uma avaliação mais objectiva das características ecográficas com o auxílio de computadores. Dada a repetibilidade desta técnica, a análise computadorizada de imagens pode servir para avaliar e comparar as características dos tecidos, com maior eficácia (Davies *et al.*, 2006).

Esta técnica assenta no modo-B em que os pixéis recebem um tom de cinzento conforme a intensidade dos ecos provenientes dessas estruturas. O que o *software* informático faz então é, atribuir um valor de 0 a 255 (0 = preto, 255 = branco) conforme o tom de cinzento para cada pixel. Depois de atribuídos esses valores, os dados podem ser tratados estatisticamente, por exemplo, calculando o valor médio de pixéis e o desvio padrão, que representam respectivamente valor de *pixel* médio e heterogeneidade de pixéis (Singh, Adams & Pierson, 2003). Esta análise não é feita para a totalidade da imagem ecográfica, tendo de se seleccionar previamente a zona que pretendemos estudar (Siqueira *et al.*, 2009a; Tom *et al.*, 1998).

## **2 APLICAÇÕES REPRODUTIVAS DA ULTRASSONOGRAFIA EM BOVINOS**

A área da reprodução de grandes animais foi a que mais beneficiou com o desenvolvimento da tecnologia de ultrassonografia. Em muitos casos, a palpação transrectal tem vindo a ser substituída pela ultrassonografia na realização de diagnósticos de gestação e de patologia uterina e ovárica. Contribuiu também com outros benefícios como a sexagem fetal e o diagnóstico de gestação precoce. Adicionalmente, é menos invasiva que a palpação transrectal em qualquer uma destas aplicações. De um ponto de vista da investigação, a ultrassonografia ofereceu a possibilidade de visualizar e caracterizar o útero, feto, ovário, CL e folículos. Medições mais precisas dos órgãos do aparelho reprodutivo abriram portas a novas pesquisas e validaram ou refutaram estudos realizados anteriormente (Lamb & Fricke, s.d.).

Uma das limitações da ultrassonografia é que apenas nos permite avaliar a nível estrutural um processo que é dinâmico (Gordon, 1996). Como tal, para que se possa tirar o máximo proveito da informação recolhida por ultrassonografia e proceder a um controlo adequado da reprodução é fundamental possuir um conhecimento aprofundado sobre as variações, estruturais e endocrinológicas, que ocorrem ao longo do ciclo reprodutivo da fêmea bovina (Gordon, 2004).

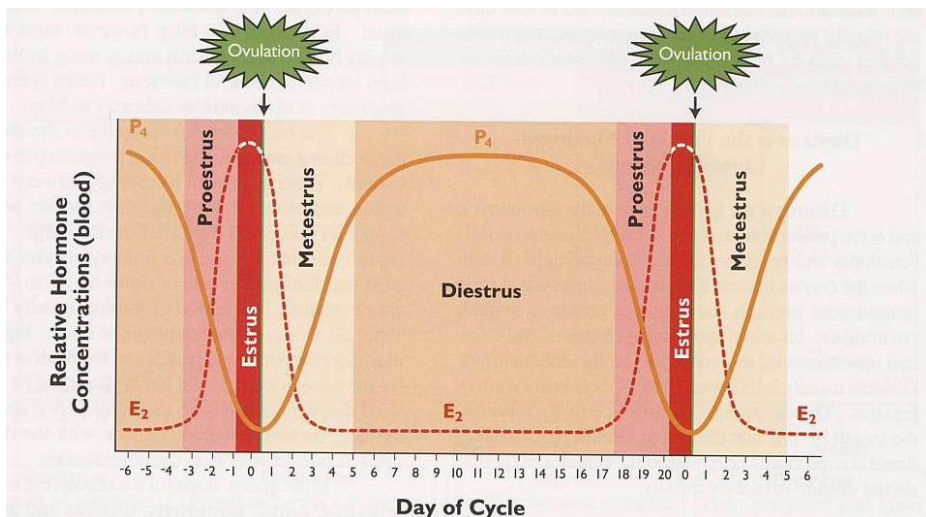
## 2.1 FISILOGIA DO CICLO ÉSTRICO

A fêmea bovina é um animal poliéstrico contínuo. Uma vez estabelecida a ciclicidade com a puberdade, os ciclos éstricos sucedem-se indefinidamente a menos que interrompidos por gestação ou patologia (Ball & Peters, 2004). O ciclo éstrico dura em média 21 dias nas vacas e 20 dias nas novilhas, variando entre 17 e 25 dias (Gordon, 1996; Ball & Peters, 2004; Jeffrey, 2007).

Com base em perfis endócrinos, padrões comportamentais, presença de estruturas ováricas, alterações uterinas e vaginais, o ciclo éstrico pode ser dividido em 4 fases: estro, metaestro, diestro e pró-estro (Hopkins, 2003) (Figura 13). Contudo, o ciclo éstrico bovino é melhor descrito em termos de função ovárica, que consiste em duas fases, a folicular que corresponde ao pró-estro e estro, e a lútea englobando metaestro e diestro (Ball & Peters, 2004; Jeffrey, 2007).

A transição da fase folicular para a fase lútea é marcada pela ovulação, já a transição da fase lútea para a fase folicular é mais complexa e é marcada pela regressão do corpo lúteo (Gordon, 2004).

Figura 13. Fases do ciclo éstrico da fêmea bovina. Retirado de Senger (2005).



### 2.1.1 Metaestro

O metaestro ocorre após o período de estro e caracteriza-se pela ausência do comportamento de receptividade sexual (Hopkins, 2003). Durante este, regista-se a fase inicial do desenvolvimento do corpo lúteo (Jeffrey, 2007). O corpo lúteo da vaca tem origem num folículo diferenciado, que após a ovulação, sofre uma reorganização das células da teca e da granulosa que originam as células lúteas pequenas e grandes, respectivamente (Gordon, 1996, 2004; Jeffrey, 2007). Inicialmente a hipertrofia destas células lúteas dá origem ao corpo hemorrágico que após maturação se torna um CL com capacidade de secreção de progesterona (Hopkins, 2003).

As células lúteas grandes representam 70% da área do CL e são responsáveis pela maioria da progesterona e totalidade da oxitocina produzidas nos ovários, possuindo também os receptores para as prostaglandinas (Gordon, 1996; Jeffrey, 2007). As células lúteas pequenas representam uma área muito menor e a sua produção de progesterona em comparação com as células lúteas grandes é muito reduzida (Gordon, 1996; Jeffrey, 2007). No entanto, possuem receptores para a hormona luteinizante (LH) que, tal como a hormona do crescimento (GH), se julga ter um papel directo no desenvolvimento da função lútea (Gordon, 2004).

### 2.1.2 Diestro

Quando o CL adquire a capacidade de sintetizar progesterona em quantidades detectáveis considera-se que se iniciou o diestro, que se estende até que as concentrações de progesterona comecem a diminuir como resultado da luteólise (Jeffrey, 2007). A progesterona é detectável a partir do dia 4 do ciclo, atingindo o pico por volta do dia 8

(Gordon, 1996; Ball & Peters, 2004; Jeffrey, 2007), o que praticamente coincide com o peso máximo do CL em desenvolvimento (Hopkins, 2003; Jeffrey, 2007).

O principal papel das concentrações elevadas da progesterona durante a fase lútea é a preparação do útero para a recepção do embrião que pode ter resultado da fertilização do oócito libertado na ovulação. A progesterona exerce também um efeito inibitório na libertação de hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) e consequentemente LH, suprimindo a maturação final dos folículos das ondas subsequentes (Ball & Peters, 2004).

### 2.1.3 Proestro

Os dias que antecedem o estro, em que se passa de uma dominância da progesterona para uma dominância de estrogénios, consideram-se o proestro (Jeffrey, 2007). A rápida regressão do CL é um evento chave no ciclo éstrico da vaca. A prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) originária no endométrio durante a fase lútea tardia é responsável pela luteólise e subsequente queda nas concentrações de progesterona (Jeffrey, 2007).

A libertação de  $PGF_{2\alpha}$  durante o ciclo éstrico bovino é estimulada pela oxitocina originária no CL que se vai ligar a receptores específicos nas células do endométrio (Ball & Peters, 2004; Jeffrey, 2007). A ligação da oxitocina a estes receptores vai estimular a conversão do ácido araquidónico em  $PGF_{2\alpha}$  (Ball & Peters, 2004).

O aumento do número de receptores para oxitocina durante a fase lútea tardia é estimulado pela exposição prolongada à progesterona e pela presença de estrogénios com origem nos folículos em crescimento (Gordon, 1996; Ball & Peters, 2004; Jeffrey, 2007). A  $PGF_{2\alpha}$  produzida no corno uterino ipsilateral ao ovário que possui o CL é transferida da veia uterina para a artéria ovárica através do mecanismo de contra corrente (Jeffrey, 2007). Na ausência deste, como uma grande parte da  $PGF_{2\alpha}$  é metabolizada nos pulmões numa só passagem, seria praticamente impossível a  $PGF_{2\alpha}$  atingir o CL nas concentrações necessárias para induzir a luteólise (Senger, 2005). Adicionalmente, o factor de necrose tumoral ( $TNF\alpha$ ) estimula a libertação de  $PGF_{2\alpha}$  pelo endométrio, indicando que também contribui para o início da regressão do corpo lúteo (Gordon, 2004).

A diminuição das concentrações séricas de progesterona vai conduzir a um aumento da frequência dos picos de LH, que durante o diestro tinham uma frequência de 1 a cada 4 horas, para 1 pico a cada hora, o que apesar da diminuição da amplitude, vai conduzir a um aumento das concentrações séricas de LH (Gordon, 1996; Hopkins, 2003; Ball & Peters, 2004; Jeffrey, 2007). Estas concentrações elevadas de LH vão estimular a secreção de estrogénio por parte dos folículos, ao ponto de conduzir ao pico pré-ovulatório de LH (Gordon, 1996).

A síntese de estrogénios exige a coordenação da actividade de dois tipos diferentes de células dentro do folículo, assim como, a actividade de duas hormonas, a LH e hormona



folículo estimulante (FSH) (Gordon, 1996). O modelo de 2 células e 2 gonadotrofinas consiste resumidamente, na produção de androgénios pelas células da teca sob a influência da LH e a sua aromatização para estrogénio nas células da granulosa sob a influência da FSH (Gordon, 1996; Jeffrey, 2007). Este estrogénio tem três funções: iniciar o comportamento de estro, preparar o aparelho reprodutivo para os processos associados à fertilização e originar o pico pré-ovulatório de LH (Ball & Peters, 2004).

#### 2.1.4 Estro

O comportamento de estro resulta da actividade dos estrogénios ováricos ao nível dos receptores presentes no hipotálamo. Este processo parece reger-se pela lei do tudo ou nada, havendo um limiar no valor de estrogénios, a partir do qual, o comportamento de estro é despoletado e, os valores acima daquele, não produzem qualquer alteração na sua duração ou intensidade (Gordon, 1996). O comportamento de estro caracteriza-se essencialmente pela receptividade sexual da fêmea bovina que aceita ser montada por outros animais, tanto machos como fêmeas. Para que o mesmo seja correctamente detectado é fundamental que os animais tenham oportunidade de interagir e, que as montas ocorram (Gordon, 1996; Hopkins, 2003; Jeffrey, 2007). O facto das fêmeas bovinas não serem receptivas em outras fases do ciclo éstrico é também importante, assegurando que o touro não desperdiça energias quando não há hipóteses de concepção (Ball & Peters, 2004).

Quando os estrogénios produzidos excedem um determinado valor limite, o hipotálamo reage com pulsos de GnRH que por sua vez vão originar uma libertação de LH e, em menor quantidade, FSH, pela hipófise. Esta libertação de gonadotrofinas apelida-se de pico pré-ovulatório (Gordon, 1996; Hopkins, 2003). O pico pré-ovulatório ocorre nas primeiras horas do estro, cerca de 24 horas antes da ovulação (Gordon, 1996). Os mecanismos que dão origem a este pico não são ainda totalmente conhecidos, mas julga-se ter origem a partir de uma síntese aumentada de GnRH em resposta aos valores dos estrogénios, ou então, estes poderão causar um aumento da sensibilidade dos receptores das gonadotrofinas da hipófise à GnRH (Gordon, 1996; Jeffrey, 2007). O fim do pico pré-ovulatório é consequência de um estado refractário à GnRH por parte da hipófise, através de um processo de “down regulation”, em que as concentrações dos receptores para a GnRH na hipófise diminuem e, por uma depleção das reservas de FSH e LH (Jeffrey, 2007).

O pico pré-ovulatório de LH tem 3 funções: iniciar a maturação final do oócito presente no folículo; induzir a ovulação, activando uma reacção inflamatória que torna a parede folicular mais fina e acaba por rupturar (Ball & Peters, 2004); e, por fim, iniciar o processo de luteinização das células que vão dar origem ao CL (Gordon, 1996).

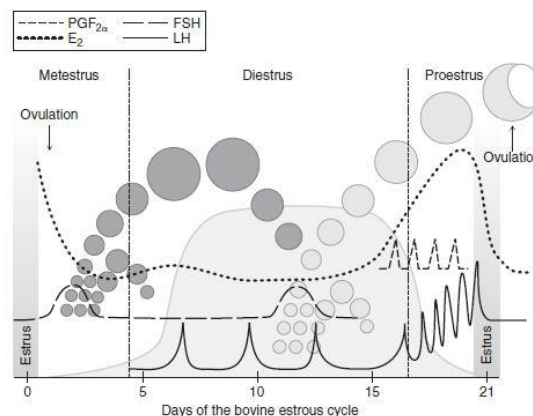
### 2.1.5 Dinâmica folicular

Durante o ciclo éstrico podem ocorrer diferentes números de ondas de crescimento folicular. Normalmente são 2, às vezes 3 e, mais raramente, 4 ondas (Gordon, 1996) (Figura 14). É sabido que os ciclos de 3 ondas de crescimento são mais longos que os de 2 ondas, e que a onda que dá origem ao folículo que vai ovular é mais curta que as anteriores (Gordon, 2004).

O crescimento folicular está sujeito a um controlo, tanto endócrino como parácrino, envolvendo factores locais: esteróides, factores de crescimento como o factor de crescimento semelhante à insulina (IGF), citocinas e outras moléculas reguladoras. Os factores de crescimento podem actuar directamente nas células dos folículos, como indirectamente através da modulação da resposta às gonadotrofinas. Em fases precoces do desenvolvimento folicular, quando os folículos são ainda pouco vascularizados, os factores parácrinos e autócrinos produzidos localmente têm um papel mais importante que os factores endócrinos. À medida que o desenvolvimento folicular continua e estes se tornam mais vascularizados, o controlo endócrino torna-se mais importante (Gordon, 1996).

As fases iniciais do crescimento dos folículos (0 – 4 mm de diâmetro) são independentes do apoio de gonadotrofinas. Contudo, a FSH é necessária para que o crescimento continue, de 4 até 9 mm. Os pulsos de LH são indispensáveis para que o folículo se desenvolva para lá dos 9 mm de diâmetro (Gordon, 1996; Wiltbank *et al.*, 2011).

Figura 14. Esquema das ondas de crescimento folicular durante o ciclo éstrico, ciclo de duas ondas. Retirado de Jeffrey (2007).



Cada onda de crescimento folicular, que é normalmente precedida por um aumento das concentrações periféricas de FSH (Gordon, 1996; Ball & Peters, 2004), caracteriza-se pelo recrutamento, de um grupo de folículos em crescimento, a partir do qual o folículo dominante (FD) vai emergir. De seguida, ocorre a selecção, processo através do qual um folículo se torna dominante e continua o seu crescimento enquanto exerce a sua dominância levando os restantes folículos (subordinados) a sofrer atresia (Gordon, 2004) (Figura 14).

O processo de dominância é, em certa medida, controlado pela produção, por parte do FD, de inibina, que actua a nível local limitando a resposta dos outros folículos e a nível da hipófise limitando a libertação de FSH (Ball & Peters, 2004).

## 2.2 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DOS OVÁRIOS

A avaliação ultrassonográfica dos ovários durante o ciclo éstrico permite-nos visualizar 2 tipos de estruturas fisiológicas: folículos e corpos lúteos (Quintela *et al.*, 2012). A vantagem da ultrassonografia relativamente à palpação transrectal reside no facto que a subjectividade inerente à estimativa, por palpação, do tamanho e conteúdo das estruturas poder ser eliminada, dado que, com o auxílio da ultrassonografia pode visualizar-se o conteúdo das estruturas, bem como realizar medições (Quintela *et al.*, 2012). Se à ultrassonografia dos ovários e útero associarmos os conhecimentos sobre o ciclo éstrico e dinâmica folicular, podemos fazer uma estimativa da fase do ciclo éstrico em que os animais se encontram (Quintela *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Estruturas fisiológicas

#### 2.2.1.1 Folículos

Um folículo pode ser facilmente identificado na imagem, uma vez que aparece como uma estrutura circular hipoeecóica envolvida pelo parênquima ovárico que apresenta uma ecogenicidade de tecido mole (Fricke, 2002) (Figura 15). Formas irregulares podem ser atribuídas à compressão exercida por estruturas adjacentes como outros folículos, um CL ou até a própria sonda. Por vezes as paredes entre dois folículos contíguos de dimensões semelhantes adoptam um formato linear ao invés do formato curvo normal, dada a compressão entre as estruturas (Ginther, 1995a).

Durante a avaliação ultrassonográfica dos ovários, é importante proceder à distinção entre um folículo e um vaso sanguíneo. Estas estruturas assemelham-se quando observados transversalmente, mas quando se obtém uma imagem longitudinal pode observar-se o perfil alongado dos vasos o que permite fazer a sua distinção dos folículos (Carrière, Gnemmi, DesCôteaux, Matsui & Colloton, 2010; Medan & Abd El-Aty, 2010).

Figura 15 Imagem ultrassonográfica de folículo (F) num ovário em contraste com a bexiga (U). Retirado de Kahn *et al.* (2004).



Como consequência do crescimento e regressão contínuos de folículos ao longo do ciclo éstrico, tentar prever o momento da ovulação baseado apenas nas dimensões do maior folículo presente no ovário pode induzir em erro. Para se proceder a essa previsão é necessário o apoio de outros indicadores como, ecogenicidade da parede uterina, presença e aspecto ultrassonográfico do corpo lúteo, presença de secreção endometrial, presença de muco cervical e alterações no comportamento do animal (Carrière *et al.*, 2010).

Têm sido registados coeficientes de correlação de 0.7 a 0.9 para várias dimensões de folículos que foram aferidas por ultrassonografia *ante-mortem*, e por corte e medição directa *post-mortem* (Sunerland *et al.* 1994, citados por Carrière *et al.*, 2010).

Algumas das potenciais aplicações clínicas da avaliação ultrassonográfica de folículos incluem: determinar o estabelecimento da puberdade em novilhas; estimar a fase do ciclo éstrico; prever a iminência da ovulação; detectar folículos pré-ovulatórios que dada a sua proximidade se tornam difíceis de diferenciar à palpação; detecção de falha de ovulação ou de estro anovulatório; avaliar se uma novilha ou uma vaca está em condições de responder a um tratamento superovulatório e monitorizar a resposta ao mesmo; diagnosticar quistos ováricos e monitorizar o seu tratamento (Ginther, 1995a).

Os artefactos mais comuns na visualização de folículos são: o reforço acústico posterior, causado pela presença de líquido dentro do folículo; reverberações, causadas pelas superfícies reflectoras da sonda, do recto e da superfície do ovário; sombra lateral, causada pela presença de estruturas circulares preenchidas por líquido; e artefactos causados pela largura do feixe de ultra-sons; todos eles contribuindo para que os limites dos folículos nem sempre sejam tão nítidos quanto o desejado (Ginther, 1995a).

Durante a medição do diâmetro folicular o cursor deve ser colocado entre o antro e a parede folicular de um lado, repetindo a marcação no lado oposto. Esta técnica de medição é utilizada porque a fronteira entre o antro e a porção interior da parede folicular é mais nítida do que a fronteira entre a porção exterior e o parênquima ovárico. A colocação do cursor é

uma fonte de variabilidade nas medições do diâmetro folicular. Para além desta fonte de variação, a determinação do mesmo está, ainda, sujeita a outras fontes de variação como a forma irregular de alguns folículos e a falha na obtenção do plano de corte transversal máximo. O diâmetro de folículos que não são completamente esféricos pode ser determinado calculando a média de dois diâmetros perpendiculares entre si. É desejável o recurso a um só operador, que não tenha ideias pré-concebidas quanto às dimensões foliculares (Ginther, 1995a).

#### 2.2.1.2 Corpo Lúteo

Em reprodução bovina, é muito importante detectar correctamente um corpo lúteo (Carrière *et al.*, 2010). A ultrassonografia tem revelado ser um método de diagnóstico mais preciso na avaliação da presença de um CL maduro, quando comparado com a palpação transrectal (Ginther, 1995a).

A presença do corpo lúteo confirma que uma novilha atingiu a puberdade. A sua localização, no ovário direito ou esquerdo, pode indicar ao clínico em que corno uterino deve pesquisar a presença do embrião ou do feto para a realização do diagnóstico de gestação.

Determinar a idade do CL pode tornar-se útil na decisão de quando iniciar um protocolo de sincronização de ovulação ou quando administrar PGF<sub>2α</sub>.

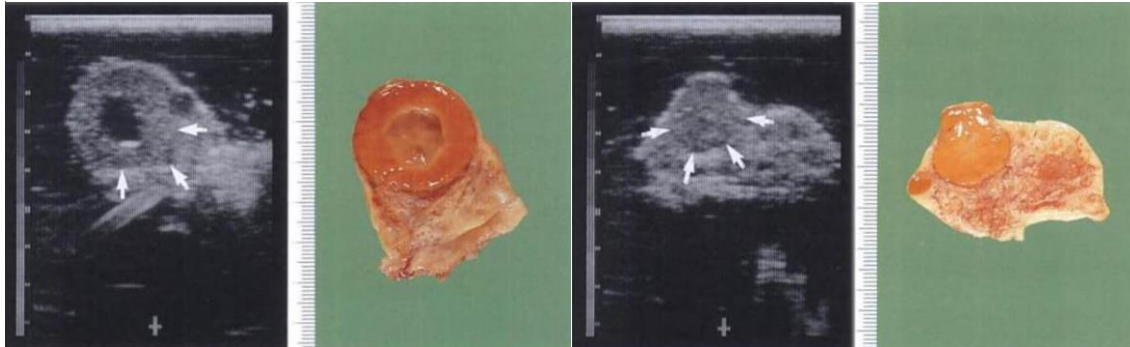
Normalmente, um CL é identificável através de ultrassonografia a partir do dia 3 após a ovulação. Um CL em desenvolvimento surge então, como uma estrutura cinzenta escura, irregular e pouco definida, com pontos de ecogenicidade superior, contido dentro do ovário. Um CL maduro revela-se como uma estrutura bem definida de ecogenicidade cinzenta granular e com uma linha de demarcação entre ele e o estroma ovárico. Num CL em regressão, a demarcação torna-se ténue dada a pequena diferença de ecogenicidade com o estroma ovárico (Medan & Abd El-Aty, 2010).

Ultrassonograficamente também é possível distinguir dois tipos morfológicos de CL, maciço e cavitário (Fricke, 2002; Carrière *et al.*, 2010) (Figura 16).

Durante os primeiros 10 dias do ciclo, 30 a 50% dos CL apresentam uma cavidade. Os corpos lúteos cavitários (CLC) são considerados estruturas normais que produzem quantidades normais de progesterona. Não alteram a duração normal do ciclo éstrico, nem reduzem a probabilidade de originar uma gestação (Ginther, 1995a; Carrière *et al.*, 2010). Excepcionalmente, alguns CL gravídicos podem apresentar uma cavidade, para além dos 30 dias. É provável que o volume de tecido lúteo seja mais importante que a presença ou ausência de uma cavidade. As cavidades podem ser centrais, excêntricas ou múltiplas. Na segunda metade do ciclo éstrico, a cavidade é, normalmente, preenchida por tecido lúteo (Carrière *et al.*, 2010). É importante não confundir quistos luteínicos (patológicos) com CLC, que são estruturas fisiológicas.

Os atributos ultrassonográficos dos CL incluindo, diâmetro máximo, área lútea e ecogenicidade têm sido correlacionados com a estrutura e a função lúteas e, quando avaliadas em alturas específicas após a beneficiação, podem tornar-se úteis como método auxiliar no diagnóstico de gestação precoce em bovinos (Fricke, 2002).

Figura 16. Imagens ultrassonográficas e secções de corte de CL cavitário (esquerda) e CL maciço (direita). Retirado de Kahn *et al.* (2004).



Legenda. As setas delimitam o CL.

O peso e a área lúteos aumentam a um ritmo coincidente com as concentrações periféricas de progesterona, durante os primeiros 8 dias do ciclo. O coeficiente de correlação entre a área lútea determinada por ultrassonografia e os valores plasmáticos de progesterona para várias fases do ciclo éstrico é de 0,68 a 0,76. Como tal, a ultrassonografia é uma alternativa viável aos doseamentos periféricos de progesterona, sendo de considerar duas excepções: durante o pró-estro, a regressão funcional do CL antecede a regressão morfológica em dois dias e, em certas situações de intoxicação por endófitos, os valores de progesterona são basais apesar de poder haver um CL maduro presente (Ginther, 1995a).

## 2.2.2 Estruturas Patológicas

### 2.2.2.1 Tumores da granulosa e teca

Apesar dos tumores da granulosa e teca serem dos mais comuns em bovinos, eles são muito raros (<0,5%) (Peter, Levine, Drost & Bergfelt, 2009; Carrière *et al.*, 2010; Quintela *et al.*, 2012). Este tipo de tumor tem sido descrito em todas as idades, desde novilhas nulíparas a vacas multíparas. Pode variar em peso, de 11,9 grama (gr) até 12,3 quilogramas (kg). Varia em tamanho e em conformação, podendo ir de estruturas pequenas e compactas até grandes e cavitárias (Quintela *et al.*, 2006).

### 2.2.2.2 Estruturas quísticas

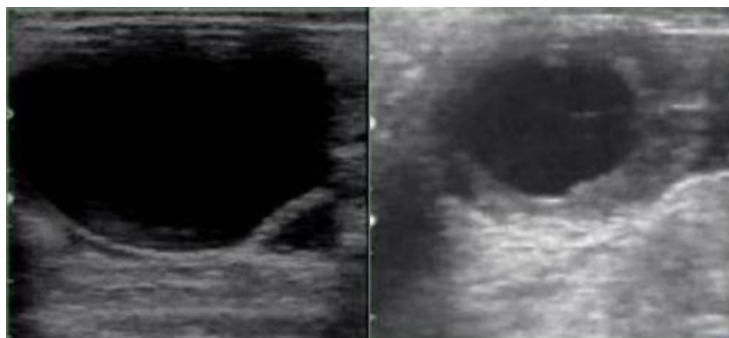
As vacas, quando examinadas no *post partum*, é comum apresentarem estruturas quísticas nos ovários. Tradicionalmente considera-se quística toda a estrutura com mais de 25 mm de diâmetro, presente no ovário durante pelo menos 10 dias (Ginther, 1995a).

Há dois tipos de estruturas quísticas ováricas, dependendo da espessura da parede: os quistos foliculares que têm uma espessura de parede inferior a 3 mm e os quistos luteínicos cuja espessura é superior a 3 mm (Vanholder, Opsomer & de Kruif, 2006). A ultrassonografia é um exame muito mais eficaz que a palpação transrectal no que toca à distinção entre quistos foliculares e luteínicos (Fricke, 2002; Quintela *et al.*, 2006; Quintela *et al.*, 2012).

A diferenciação entre estes dois tipos de estruturas é bastante útil no que diz respeito à escolha da terapia adequada. A ultrassonografia é também útil na monitorização da resposta aos tratamentos hormonais subsequentes (Ginther, 1995a).

Ao exame ultrassonográfico, os quistos foliculares aparecem como folículos de grandes dimensões, normalmente maiores que os folículos normais. Os quistos luteínicos surgem com paredes mais espessas, com um aspecto semelhante a um CLC (Quintela *et al.*, 2006).

Figura 17. Imagem ultrassonográfica de quisto folicular (esquerda) e quisto luteínico (direita). Adaptado de Quintela *et al.* (2006).



Morfológicamente, os CLC são indistinguíveis dos quistos luteínicos, a menos que se tenham realizado ultrassonografias diárias de maneira a comprovar que ocorreu ovulação. Contudo esta distinção é meramente académica, visto que ambas as estruturas respondem de igual maneira à administração de prostaglandinas (Carrière *et al.*, 2010).

## 2.3 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DO ÚTERO

### 2.3.1 Avaliação ultrassonográfica do útero não gravídico

A utilização de ultrassonografia em fêmeas bovinas não gestantes pode servir tanto para determinar a fase do ciclo éstrico em que se encontram, assim como para diagnosticar condições patológicas (Beal, Perry & Corah, 1992). Para além disso permite avaliar a resposta a tratamentos, assim como certificar que o útero voltou ao seu estado fisiológico após o parto, avaliando o seu diâmetro, a ecotextura e conteúdo intra-luminal (DesCôteaux, Chastant-Maillard, Gnemmi, Colloton & Bollwein, 2010c).

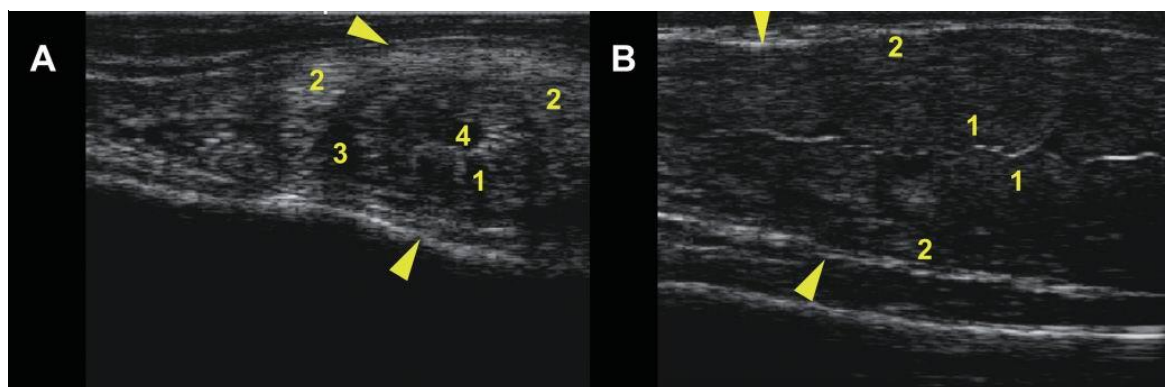
#### 2.3.1.1 Determinação da fase do ciclo éstrico

As variações dos níveis circulantes de progesterona e estradiol são responsáveis pelas alterações do aspecto ultrassonográfico que o útero revela ao longo do ciclo éstrico (DesCôteaux *et al.*, 2010c).

Para determinar a fase do ciclo éstrico podemos nos basear, no aspecto tanto da submucosa como do endométrio (Griffin & Ginther, 1992). Durante a fase folicular, a ecotextura uterina é resultado de um aumento do aporte sanguíneo, da secreção de muco por parte das células das glândulas endometriais e do edema que o útero apresenta (Barlund, Carruthers, Waldner & Palmer, 2008; DesCôteaux *et al.*, 2010c). A imagem ultrassonográfica é caracterizada por 3 camadas concêntricas de cor preta, cinzenta e novamente preta. A zona central é preta devido à presença de muco anecogénico (Kahn, Volkmann & Kenney, 2004; DesCôteaux *et al.*, 2010c), a camada seguinte é o endométrio que aparece com uma espessura de 1 cm e de cor cinzenta e, finalmente, a submucosa como resultado do aumento da vascularização vai surgir também representada a preto (DesCôteaux *et al.*, 2010c). Durante esta fase, quando as superfícies do endométrio justapostas se tocam, vão produzir uma imagem em que se pode observar uma linha hiperecogénica no lúmen uterino (Kahn *et al.*, 2004) (Figura 18).



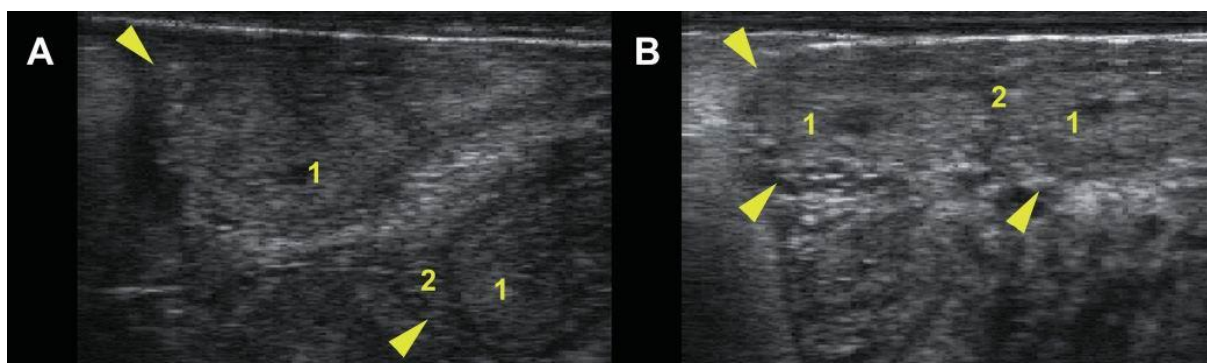
Figura 18. Imagem ultrassonográfica de cortes transversal (A) e longitudinal (B) de útero em estro. Retirado de DesCôteaux *et al.* (2010c).



Legenda. 1: Endométrio hiperecogénico; 2: Miométrio; 3: Porção vascular da parede uterina; 4: Lúmen uterino contendo muco. As setas representam os limites do útero.

Durante o diestro, com a diminuição do tônus uterino como resultado da subida dos valores de progesterona, o endométrio surge com menor espessura, a distinção entre o endométrio e miométrio é menos notória, devido a uma ecogenicidade mais uniforme e, nesta fase, normalmente, não há presença de líquido no lúmen uterino (Kahn *et al.*, 2004; DesCôteaux *et al.*, 2010c) (Figura 19).

Figura 19. Imagem ultrassonográfica de cortes de útero em diestro nos dias 8 (A) e 15 (B) do ciclo. Retirado de DesCôteaux *et al.* (2010c).



Legenda. 1: Endométrio; 2: Miométrio. As setas indicam os limites do útero.

#### 2.3.1.2 Diagnóstico de patologia uterina

A identificação de condições patológicas com origem no útero é outra das possibilidades do exame ultrassonográfico, dado que o processo inflamatório constitui uma das mais frequentes condições que origina perda de ecogenicidade (Quintela *et al.*, 2012). A ultrassonografia é pois, um método mais objectivo e preciso na avaliação da saúde uterina de um animal, quando comparada com a palpação transrectal (DesCôteaux *et al.*, 2010c).

Metrite puerperal, endometrite, piómetra e abscessos são as condições uterinas infecciosas mais comuns em fêmeas bovinas. De resto, podem destacar-se outras duas condições patológicas não infecciosas, a mucómetra e a fisómetra (DesCôteaux *et al.*, 2010c). Apesar de alguns destes processos poderem ser correctamente diagnosticados através do exame clínico, de palpação transrectal ou vaginoscopia, a ultrassonografia é um método de diagnóstico mais eficiente (Barlund *et al.*, 2008).

Em diversos estudos, os resultados obtidos por vaginoscopia, palpação transrectal e ultrassonografia foram comparados com a citologia uterina, que é considerada o *golden standart* dos diagnósticos de patologia uterina. Concluiu-se que, excluindo a citologia, a ultrassonografia é a melhor opção para o diagnóstico de patologia uterina (Quintela *et al.*, 2012). Contudo, a citologia uterina não é uma metodologia que forneça resultados em tempo oportuno, o que leva a que a sua aplicabilidade na prática corrente seja reduzida. Neste contexto, a ultrassonografia permite fazer um diagnóstico imediato com um elevado índice de fiabilidade (DesCôteaux *et al.*, 2010c).

Quando a endometrite não é acompanhada por acumulação de líquido no lumen uterino, o valor do exame ultrassonográfico para detectar alterações causadas pela endometrite é reduzido (Kahn *et al.*, 2004). No entanto, quando é observável líquido há uma correlação positiva entre a sua quantidade e o desenvolvimento bacteriano em amostras de fluido recolhidas (Mateus, Lopes da Costa, Bernardo & Robalo Silva, 2002).

A diferença do aspecto ultrassonográfico, entre mucómetra e piómetra é que o muco estéril tem um aspecto anecogénico, ao passo que o conteúdo inflamatório apresenta um grau de ecogenicidade dependente da quantidade de elementos celulares presentes (Kahn *et al.*, 2004; Quintela *et al.*, 2006). Os abscessos aparecem como estruturas preenchidas por uma grande quantidade de material, de ecogenicidade não uniforme e com várias partículas hiperecogénicas no seu interior, delimitadas por uma cápsula (DesCôteaux *et al.*, 2010c).

### 2.3.2 Diagnóstico de gestação

Um DG precoce ajuda a melhorar a performance reprodutiva, ao diminuir o intervalo entre inseminações sucessivas, por via de estratégias terapêuticas a que fêmeas cujos DG foram negativos são sujeitas (Medan & Abd El-Aty, 2010; Quintela *et al.*, 2012). Para reduzirem-se os efeitos da mortalidade embrionária tardia que pode vir a ocorrer, consequência de se fazer o DG mais precocemente, os DG positivos devem ser, mais tarde reconfirmados, de maneira a inseminar ainda a tempo, as fêmeas então vazias (Quintela *et al.*, 2012).

Apesar de em média, um DG realizado por ultrassonografia consumir mais tempo que por palpação, o primeiro fornece muito mais informação, o que compensa o maior dispêndio de tempo. Com a ultrassonografia detecta-se mais facilmente gestações gemelares e faz-se

uma avaliação mais precisa da idade gestacional e da viabilidade embrio-fetal (Fricke, 2002).

Na prática, para se obter um DG positivo devem pesquisar-se os seguintes sinais: dilatação e presença de líquido no lúmen do corno uterino ipsilateral ao ovário que apresenta um CL maduro; presença de membranas fetais; presença do embrião e avaliar o seu batimento cardíaco. Se todos estes sinais estiverem presentes podemos concluir que a fêmea está gestante (Quintela *et al.*, 2006).

A simples detecção de líquido intra-luminal não deve ser interpretada como um sinal fidedigno de gestação, uma vez que podem surgir secreções intra-luminais em qualquer altura do ciclo éstrico. Como tal, deve proceder-se sempre à detecção das membranas fetais e do embrião (Kahn *et al.*, 2004).

Nos primeiros 20 dias de gestação, a ultrassonografia não constitui um método fiável para se proceder ao diagnóstico, uma vez que é praticamente impossível realizar o diagnóstico diferencial de outras causas de acumulação de líquido anecogénico no lúmen uterino, como o período de estro ou certas situações patológicas (Kahn *et al.*, 2004; DesCôteaux, Colloton, Gayrard & Picard-Hagen, 2010b; Quintela *et al.*, 2012).

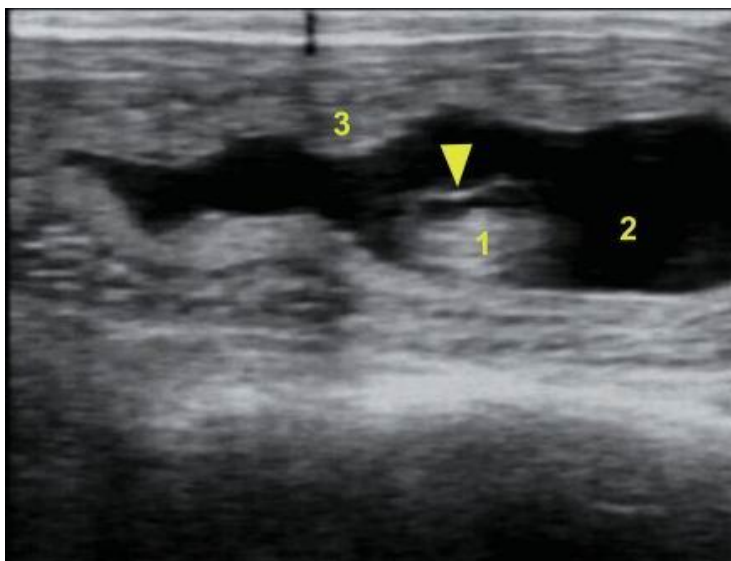
Kastelic *et al.* (1989) citados por Kahn *et al.* (2004) documentaram que, entre os dias 20 e 23 pós-inseminação, era possível realizar diagnósticos negativos de gestação com base nas dimensões reduzidas do CL. Porém, um diagnóstico positivo de gestação só podia ser feito com um maior grau de certeza uma vez identificado o embrião, ou seja, mais tarde.

O momento a partir do qual é possível realizar o DG vai depender fortemente da frequência e da qualidade da sonda utilizada. Com uma sonda de 5 Mhz é possível, em condições normais e com alguma facilidade, demonstrar a presença da vesícula embrionária, a partir do dia 25 pós-inseminação (Kahn *et al.*, 2004; DesCôteaux *et al.*, 2010b). A partir desse dia, a ausência de líquido intra-luminal indica, com alguma certeza, que o DG é negativo (Kahn *et al.*, 2004). A ultrassonografia apresenta uma sensibilidade superior a 95% ao dia 26 e próxima de 100% após o dia 29 (DesCôteaux *et al.*, 2010b).

As causas mais prováveis de falsos positivos no diagnóstico de gestação entre os dias 21 e 26 são a acumulação de líquido do pró-estro ou estro ou quando estão gestantes no momento do DG, mas são posteriormente, sede de um processo de mortalidade embrionária (Lamb & Fricke, s.d.).

A ecogenicidade do embrião é ligeiramente superior à do endométrio (Quintela *et al.*, 2006). Uma vez que, durante a fase inicial da gestação, o embrião se encontra bastante próximo da parede uterina, a sua identificação pode revelar-se difícil (Quintela *et al.*, 2012). A partir do dia 25 começa a projectar-se da parede e por volta do dia 30 já se encontra completamente envolvido por líquido (Kahn *et al.*, 2004; DesCôteaux *et al.*, 2010b) (Figura 20). A quantidade de líquido e a distensão uterina vai depender da fase da gestação e da paridade da fêmea (DesCôteaux *et al.*, 2010b).

Figura 20. Imagem ultrassonográfica de gestação de 30 dias. Retirado de DesCôteaux *et al.* (2010b).



Legenda. 1: Embrião; 2: Líquido alantóico; 3 Prega uterina. A seta indica o amnion.

O batimento cardíaco torna-se visível por volta dos 25 dias de gestação e aparece como uma luz a piscar no centro do embrião (DesCôteaux *et al.*, 2010b). A avaliação do batimento cardíaco permite-nos aferir a viabilidade do embrião e deve ser de aproximadamente 145 batimentos por minuto, entre os 26 e os 60 dias de gestação (DesCôteaux *et al.*, 2010b; Quintela *et al.*, 2012). A partir do dia 45, a viabilidade fetal pode aferir-se pelos movimentos do feto. Por fim, é importante observar se o aspecto e a quantidade de líquido envolvendo o embrião ou o feto são os adequados (DesCôteaux *et al.*, 2010b).

#### 2.3.2.1 Determinação do número de fetos

O diagnóstico de gestações gemelares é bastante importante no manejo das explorações de bovinos de leite, uma vez que os riscos de perdas gestacionais, freemartinismo e distócia são superiores às de gestações singulares (Quintela *et al.*, 2012).

Esta questão adquiriu especial importância nos últimos anos uma vez que com o melhoramento genético e aumento da produção leiteira, a taxa de gestações gemelares sofreu um grande aumento. Este aumento resulta da elevação da taxa de duplas ovulações, como resultado de um aumento do metabolismo hepático das hormonas esteróides (Wiltbank, Lopez, Sartori, Sangsritavong & Gümen, 2006).

A presença de 2 CL nos ovários no momento do DG pode conduzir à suspeita de se tratar de uma gestação gemelar (Fricke, 2002). Metade das vacas com DG positivo e que apresentam 2 CL, têm uma gestação gemelar (DesCôteaux *et al.*, 2010b).

Fêmeas bovinas com gestações gemelares podem ser correctamente identificadas por ultrassonografia transrectal entre os 40 e os 55 dias pós inseminação (Kahn *et al.*, 2004; Medan & Abd El-Aty, 2010).

Uma avaliação meticulosa de todo o lúmen uterino é crítica para a identificação de gestações gemelares. À ultrassonografia, o útero apresenta mais líquido do que seria de esperar para a idade gestacional, uma quantidade superior de membranas amnióticas do que numa gestação singular e, por vezes, é visível uma “linha de gémeos”. A “linha de gémeos” resulta da porção da membrana corioalantoica que é partilhada pelos dois fetos e surge como uma linha hiperecogénica (DesCôteaux *et al.*, 2010b) (Figura 21).

Uma vez diagnosticada uma gestação gemelar, há 3 cenários possíveis: pode refugar-se o animal; induzir o aborto e voltar a inseminar; ou então, deixar a gestação prosseguir até termo. A indução de aborto não é boa prática visto que animais que abortam demoram muito tempo até voltarem a ficar gestantes e o risco de voltarem a desenvolver uma gestação gemelar é elevado. Deixar prosseguir a gestação comporta uma série de riscos já mencionados e, para além disso, mesmo que a vaca consiga parir sem problemas, a probabilidade de desenvolver problemas metabólicos no pós-parto é bastante elevada (Fricke, 2002; DesCôteaux *et al.*, 2010b).

Figura 21. Imagem ultrassonográfica de gestação gemelar de 30 dias. Retirado de DesCôteaux *et al.* (2010b).



Legenda. 1: Embriões. A seta aponta para a “linha de gémeos”.

### 2.3.2.2 Determinação do sexo fetal

A ultrassonografia transrectal pode ser utilizada para determinar o sexo do feto bovino (Fricke, 2002). A sexagem fetal pode ser feita através da localização do tubérculo genital, do escroto ou glândula mamária. A melhor altura para a realização deste exame ultrassonográfico é entre os 55 e os 60 dias de gestação (Fricke, 2002; Medan & Abd El-Aty, 2010).

A eficácia do diagnóstico vai depender da experiência do operador, da qualidade do equipamento e das condições de trabalho. Em condições normais, um operador experiente obtém taxas de eficácia a rondar os 100% (DesCôteaux *et al.*, 2010a; Medan & Abd El-Aty, 2010).

A possibilidade de determinação do sexo fetal diminui à medida que a gestação progride para além do primeiro trimestre. Em gestações avançadas, há dois factores que a dificultam. Primeiro, à medida que o feto cresce torna-se mais difícil colocar a sonda na posição ideal para se obter uma imagem que permita realizar o diagnóstico do sexo fetal. Segundo, o corno uterino grávidico começa a descer para a cavidade abdominal, tornando a determinação do sexo fetal impossível sem a retracção do corno grávidico (Fricke, 2002; Quintela *et al.*, 2006; DesCôteaux *et al.*, 2010a; Lamb & Fricke, *s.d.*).

Em sistemas de produção leiteira, a determinação do sexo fetal torna-se útil quando combinado com decisões e estratégias de manejo que justifiquem o custo desta tecnologia (Fricke, 2002).

Esta opção técnica pode ser utilizada para cumprir contratos de vendas que exijam um determinado sexo do feto de uma fêmea gestante para venda. Assim como para determinar a decisão de refugar ou não uma fêmea gestante, consoante o sexo do feto interessa ou não ao produtor (DesCôteaux *et al.*, 2010a; Quintela *et al.*, 2012; Lamb & Fricke, *s.d.*). Ocasionalmente, esta tecnologia pode servir para determinar a eficácia da sexagem de sémen ou de embriões sem ter de esperar pelo momento do parto (DesCôteaux *et al.*, 2010a).

Os tubérculos genitais, de ambos os sexos, assim como as protuberâncias genitais e pregas urogenitais do macho, são estruturas altamente ecogénicas. O tubérculo genital é representado como uma estrutura bilobada com ecogenicidade semelhante à do osso (Kahn *et al.*, 2004; DesCôteaux *et al.*, 2010a; Quintela *et al.*, 2012).

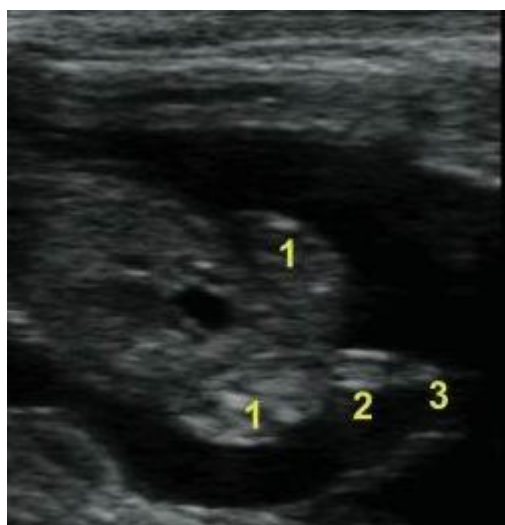
Apesar da aparência do tubérculo genital ser semelhante em ambos os sexos, o dimorfismo sexual é determinado pela sua localização entre os dias 58 e 65 de gestação (Quintela *et al.*, 2006). Inicialmente, o tubérculo genital está posicionado entre os membros posteriores, tanto no macho, como na fêmea. Entre o dia 40 e 60, sofre uma migração em direcção ao umbigo, nos fetos masculinos e, em direcção à base da cauda, nos femininos (Kahn *et al.*, 2004; Quintela *et al.*, 2006; DesCôteaux *et al.*, 2010a) (Figuras 22 e 23).

No macho, o tubérculo genital, as pregas urogenitais e as protuberâncias genitais originam o pênis, prepúcio e o escroto, respectivamente. Na fêmea, as protuberâncias genitais sofrem atrofia e ao dia 50 já estão ausentes. O tubérculo genital origina o clitóris e as pregas urogenitais formam a vulva (Kahn *et al.*, 2004; Quintela *et al.*, 2006; DesCôteaux *et al.*, 2010a)

Entre o dia 65 e 70, a maioria dos fetos machos sofrem uma alteração a nível do aspecto do tubérculo genital. A estrutura bilobada dá origem a uma estrutura de quatro lóbulos que representa o tubérculo genital e as pregas urogenitais. Por esta altura, as protuberâncias genitais encontram-se fundidas ao nível da linha média entre os membros posteriores e são visualizadas como duas linhas hiperecogénicas formando o escroto (DesCôteaux *et al.*, 2010a) (Figura 23).

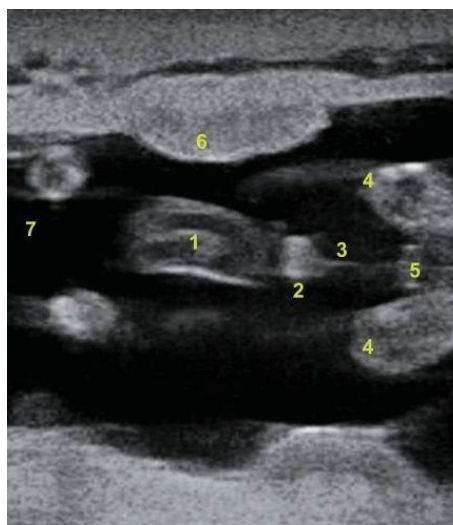
A partir dos dias 80-90 os tetos em desenvolvimento dos fetos femininos tornam-se visíveis. Como resultado da sua intensa ecogenicidade tornam-se evidentes ao originarem 4 pontos hiperecogénicos dispostos na forma de um quadrado (Kahn *et al.*, 2004; Quintela *et al.*, 2006).

Figura 22. Imagem ultrassonográfica de feto fêmea com 60 dias. Retirado de DesCôteaux *et al.* (2010a).



Legenda. 1: Membros posteriores; 2: Tubérculo genital; 3 cauda.

Figura 23. Imagem ultrassonográfica de feto macho com 68 dias. Retirado de DesCôteaux *et al.* (2010a).



Legenda. 1: Cordão umbilical; 2: Tubérculo genital; 3 linha mediana; 4: Membros posteriores; 5: protuberâncias genitais; 6: Placentoma; 7: Membros anteriores.



## 2.4 AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA FUNÇÃO REPRODUTIVA DO TOURO

Apesar da ultrassonografia ser uma ferramenta bastante utilizada, tanto em investigação como em clínica, para avaliação do aparelho reprodutivo das fêmeas bovinas, o seu uso nos touros é bastante reduzido (Kastelic & Brito, 2012).

Recomenda-se que o uso de ultrassonografia para avaliação do aparelho reprodutivo do touro seja acompanhado por um exame andrológico completo, ou pelo menos parcial, de maneira a avaliar a integridade do aparelho reprodutivo, assim como detectar e caracterizar anomalias que a ultrassonografia por si só, não consegue.

As condições que normalmente levam a que seja realizada uma avaliação ultrassonográfica do aparelho reprodutivo do touro são: azoospermia; percentagem elevada de espermatozóides anormais; piospermia; forma ou tamanho alterado de órgãos do aparelho reprodutivo; e dor inexplicada (Gnemmi & Lefebvre, 2010).

### 2.4.1 Técnica

O touro é geralmente abordado pela rectaguarda, após a inspecção dos testículos e escroto, a sonda é então justaposta à superfície caudal do escroto. Para se obter uma imagem de melhor qualidade pode molhar-se a pele com água morna e gel. Primeiro, avalia-se um testículo de cada vez pressionando o outro dorsalmente. Depois de serem examinados em separado, pressionam-se ventralmente de maneira que a avaliação seja agora em simultâneo, movendo a sonda numa posição horizontal percorrendo a totalidade do parênquima testicular. Para além do parênquima, deve avaliar-se todo o escroto, incluindo epidídimos, túnicas testiculares e cordões espermáticos.

Para se proceder à avaliação ultrassonográfica das glândulas acessórias (glândulas bulbouretrais, uretra pélvica, próstata, ampola e glândulas vesiculares), um exame por palpação transrectal deve ser realizado previamente à inserção da sonda no recto (Gnemmi & Lefebvre, 2009, citados por Kastelic & Brito, 2012).

Para se verificar da inocuidade desta técnica, foram realizados exames clínicos ultrassonográficos aos aparelhos reprodutivos de alguns touros e foi definido um protocolo de recolha de sémen, duas vezes por semana, durante 10 semanas. Ao verificar-se que não houve efeitos significativos na mortalidade e morfologia dos espermatozóides, chegou-se à conclusão que um exame clínico ultrassonográfico, por si, não afecta quer o volume, quer a qualidade do sémen produzido (Kastelic & Brito, 2012).



#### 2.4.2 Aspecto ultrassonográfico dos testículos e escroto

O parênquima testicular é homogêneo e de ecogenicidade moderada. O mediastino testicular tem aproximadamente 2 a 4 mm de largura e localiza-se no centro do parênquima. Surge como uma linha ou um círculo, consoante a sonda é colocada paralela ou perpendicularmente ao eixo maior do testículo. A cabeça e a cauda do epidídimo são facilmente detectadas, uma vez que apresentam uma menor ecogenicidade que o parênquima testicular. A cabeça encontra-se na porção cranial do polo proximal do testículo e é mais facilmente visualizada num plano sagital. A cauda encontra-se ventralmente ao polo distal do testículo. Tanto o corpo do epidídimo como o ducto deferente são pequenas estruturas tubulares que correm ao longo da face medial da porção caudal dos testículos. Na ausência de fluido entre a túnica vaginal e a albugínea, elas surgem como uma linha hiperecogénica entre o parênquima testicular e o escroto (Kastelic & Brito, 2012).

#### 2.4.3 Utilidade de um exame ultrassonográfico como complemento do exame andrológico convencional

A ultrassonografia pode ser utilizada para detectar e caracterizar algumas condições patológicas dos órgãos genitais do touro, sendo as mais comumente identificadas: orquite, degenerescência testicular, hidrocelo, hematocelo, hipoplasia testicular e epididimite.

Contudo, apesar da ultrassonografia ser uma ferramenta útil na detecção e caracterização de algumas patologias, esta técnica apresenta reduzido valor diagnóstico na ausência de lesões macroscópicas uma vez que, por exemplo, em algumas situações de degenerescência testicular ligeira não se encontrou qualquer tipo de alteração do aspecto ultrassonográfico.

De salientar, ainda, que apesar das zonas de ecogenicidade aumentada serem comuns, principalmente em touros jovens, não estão associadas a uma diminuição da qualidade do sémen. Porém, se afectarem uma porção grande do parênquima testicular, a produção total de sémen pode ser afectada (Kastelic & Brito, 2012).

Não foi possível estabelecer, em diversos estudos, uma associação entre a ecogenicidade, através da avaliação da intensidade dos pixéis por análise computadorizada, e a qualidade do sémen. Esta situação foi atribuída ao facto do estado de saúde do parênquima testicular e tubos seminíferos não se reflectir na qualidade seminal nesse preciso momento, mas sim, 70 dias depois, dado que são necessários 62 dias para a formação (espermatogénese) e 11 para o transporte epididimário do sémen (Barth & Oko, 1989, citados por Kastelic & Brito, 2012). Deste modo, o aspecto ultrassonográfico do parênquima testicular parece estar mais intimamente associado à qualidade do sémen a ser recolhido no futuro do que à sua qualidade no momento. Contudo, os resultados de estudos que compararam o aspecto

ultrassonográfico do parênquima testicular e a qualidade do sémen recolhido várias semanas mais tarde, não têm sido consistentes. Para além disso, a utilização da análise computadorizada de imagens exige equipamento especializado e é praticamente impossível de implementar na prática clínica comum.

Foi também demonstrado que à medida que um novilho atinge a puberdade, a ecogenicidade testicular aumenta. Também esta foi avaliada objectivamente utilizando a análise computadorizada de imagens. Esta avaliação, no entanto, não se mostrou superior à medição da circunferência escrotal, como factor preditivo da puberdade.

Em conclusão, a avaliação da função reprodutiva do touro deve apoiar-se na história pregressa, avaliação clínica, colheita e análise de sémen. Se alguma situação anormal for encontrada, a ultrassonografia pode contribuir para o seu diagnóstico de uma maneira relativamente inócua. No fundo, a sua maior vantagem resulta da caracterização de lesões macroscópicas detectadas num exame andrológico convencional (Kastelic & Brito, 2012).

## 2.5 APLICAÇÕES DO MODO DOPPLER EM REPRODUÇÃO BOVINA

O desenvolvimento do modo Doppler alargou o espectro da ultrassonografia. Uma ferramenta que permitia avaliar as estruturas de um ponto de vista anatómico, passou a permitir uma análise do estado fisiológico das mesmas.

Vários estudos demonstraram que a utilização desde modo ultrassonográfico, quando utilizado por via transrectal, permite a avaliação do fluxo sanguíneo nas artérias uterinas em qualquer fase do ciclo éstrico, gestação ou período pós-parto (Herzog & Bollwein, 2007). Durante estes períodos, podem ser observadas alterações características do fluxo sanguíneo uterino. O fluxo sanguíneo uterino é baixo durante o diestro e elevado durante o pró-estro e estro (Bollwein *et al.*, 2000). Durante a gestação, observa-se um crescimento exponencial do fluxo sanguíneo uterino, tendo sido descrita uma relação entre o fluxo sanguíneo uterino no final da gestação e o peso do vitelo à nascença (Bollwein, Baumgartner & Stolla, 2002).

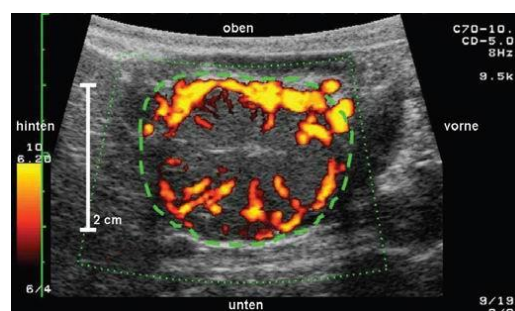
Em vacas, com alterações patológicas do puerpério foi observado um atraso na diminuição do fluxo sanguíneo uterino que, normalmente, é observado na primeira semana pós-parto.

Ocorrem também alterações características do fluxo sanguíneo do corpo lúteo durante o ciclo éstrico que estão fortemente relacionadas com os níveis circulantes de progesterona. Verificou-se também, que o fluxo sanguíneo do CL no início da luteólise, ao contrário do que seria de se esperar, antes de sofrer uma redução, aumenta. Demonstrou-se também, que há uma correlação muito positiva entre o pico pré-ovulatório de LH e o fluxo sanguíneo do folículo antes da ovulação (Herzog & Bollwein, 2007).

Foi também estudada a possibilidade de realizar um DG com base nas alterações do fluxo sanguíneo do CL (Figura 24). O objectivo era o de quantificar as alterações do fluxo

sanguíneo do CL e do volume do CL entre vacas gestantes e não gestantes, durante o período de luteólise natural e gestação precoce, avaliando-se a possibilidade de utilizar as diferenças ao nível do fluxo sanguíneo do CL como indicador precoce do estado de gestação. A conclusão a que se chegou foi que o fluxo sanguíneo do CL, aferido por modo Doppler, pode ser utilizado para identificar as vacas que não se encontram gestantes, uma vez que estas apresentam uma diminuição do fluxo sanguíneo do CL após a luteólise. Porém, dado o elevado número de vacas que sofre um processo de mortalidade embrionária após um diagnóstico tão precoce, recomenda-se que este método não seja utilizado isoladamente num programa reprodutivo. É mais vantajoso que os técnicos esperem mais uns dias, de maneira a poder realizar um DG com o modo B, sendo que a avaliação do fluxo sanguíneo do CL poderia servir de complemento (Utt, Johnson & Beal, 2009).

Figura 24. Imagem ultrassonográfica em modo Doppler das vascularizações do CL de uma vaca em diestro. Retirado de Herzog e Bollwein (2007).



Quanto à mortalidade embrionária e fetal, a avaliação do fluxo sanguíneo do CL pode ser utilizada para diagnosticar aquelas condições e, não só, para fazer o DG. A regressão do CL precede a morte embrionária quando esta ocorre antes do dia 25 de gestação, mas se a mesma ocorrer entre os dias 25 e 40, a regressão do CL vai atrasar-se até 3 dias (Kastelic *et al.*, 1991, citados por Quintela *et al.*, 2012). Deste modo, a medição do fluxo sanguíneo do CL pode servir para prever ou confirmar a mortalidade embrionária (Quintela *et al.*, 2012).

Quanto ao fluxo sanguíneo da parede dos folículos e sua relação com a fertilidade, num estudo com novilhas Holstein que foram inseminadas 26 horas após uma administração de GnRH, a quem se tinha administrado PGF<sub>2α</sub> 36 horas antes, Siddiqui *et al.* (2009) descobriram que o fluxo sanguíneo da parede dos folículos no momento da inseminação era superior em novilhas que viriam a ficar gestantes em comparação com as restantes. Concluíram pois, que havia uma relação directa entre o fluxo sanguíneo do folículo pré-ovulatório e o sucesso da IA (Quintela *et al.*, 2012).

Em suma, todos estes estudos permitiram verificar que o modo Doppler é uma ferramenta de investigação que permite avaliar o fluxo sanguíneo dos vários componentes do aparelho reprodutivo e fornecer informação relativa ao estado fisiológico destes durante as várias

fases do ciclo reprodutivo da vaca. Assim, ele pode tornar-se numa alternativa ao modo B para o diagnóstico de várias condições, patológicas ou fisiológicas, com sede no aparelho reprodutivo (Herzog & Bollwein, 2007).

## 2.6 PUNÇÃO FOLICULAR ECOGUIADA

Qualquer tipo de transductor pode ser utilizado neste tipo de procedimento, no entanto uma sonda sectorial de frequência entre 5 e 7,5 MHz é recomendada para a visualização de folículos mais pequenos (Quintela *et al.*, 2006). A agulha pode ser direccionada por um canal dentro do próprio transductor ou simplesmente à mão e apresenta uma ponta com ecogenicidade característica para facilitar a sua condução face ao alvo. Quando a agulha atravessa o feixe de ultra-sons, pode ser visionada com bastante nitidez o que permite que o percurso da mesma possa ser determinado e o seu direccionamento seja feito com bastante precisão. Este procedimento já é utilizado comercialmente em reprodução bovina numa técnica designada por foliculocentese ecoguiada [*Ovum pick up* (OPU)] (Medan e Abd El-Aty, 2010).

Ela surgiu como alternativa à aspiração dos folículos de ovários colhidos em matadouros para obtenção de oócitos para fertilização *in vitro*. Este procedimento tinha dois grandes inconvenientes: não haver informação relativa à situação endócrina e sanitária da fêmea dadora e, era uma técnica não repetível, o que a tornava inviável em fêmeas de elevado mérito genético.

Assim, a OPU permite a recolha de oócitos de fêmeas, sem interferir com o seu ciclo reprodutivo. Resumidamente, consiste em colocar o transductor no fundo da vagina com auxílio de um cabo de plástico que facilita a manipulação da sonda e com uma mão colocada no recto conduz-se o ovário de maneira a colocá-lo em frente daquela e com os folículos em posição adequada à sua aspiração. De seguida, punciona-se fazendo a agulha atravessar a parede do fundo da vagina e do folículo (Quintela *et al.*, 2006; Stroud & Durocher, 2010). Normalmente, o número de oócitos recuperados por sessão varia entre 3 e 10 e representa aproximadamente 60 a 70% dos folículos aspirados.

Um ritmo de uma punção semanal não interfere com a ciclicidade. No entanto, se ele for aumentado para duas vezes por semana, vai induzir-se uma situação de anestro por ausência de desenvolvimento de folículos dominantes. Este anestro manter-se-á enquanto o ritmo de recolha se perpetuar.

As fêmeas submetidas a punções semanais durante um longo período de tempo, 3 a 5 meses, não apresentam alterações da sua capacidade reprodutiva, ainda que se verifique um ligeiro espessamento da cápsula ovárica. Estes animais expressam cio nas semanas que se seguem à última recolha e uma elevada percentagem fica gestante quando inseminada (Quintela *et al.*, 2006).

### **3 APLICAÇÕES DA ULTRASSONOGRAFIA EM PROTOCOLOS DE IATF**

A ultrassonografia, quando utilizada em conjunto com protocolos de IATF torna-se uma ferramenta muito poderosa. Em programas de IATF, esta tecnologia pode ser utilizada para: avaliação do estado de saúde do aparelho reprodutivo, detecção de animais em anestro, selecção do protocolo de controlo hormonal do ciclo mais adequado e, para realização de um diagnóstico de gestação precoce (Carrière *et al.*, 2010).

No que toca à detecção de patologia uterina e ovárica, a ultrassonografia é uma técnica mais precisa que a palpação transrectal (Fricke, 2002; Quintela *et al.*, 2006; DesCôteaux *et al.*, 2010c; Quintela *et al.*, 2012). Assim, com um exame ultrassonográfico realizado antes de dar início a um qualquer protocolo, podemos detectar atempadamente fêmeas com anomalias de função reprodutiva que iriam ter baixa performance reprodutiva independentemente do protocolo utilizado e, deste modo, pouparmos o dinheiro que seria investido em hormonas, sémen, mão-de-obra e tempo.

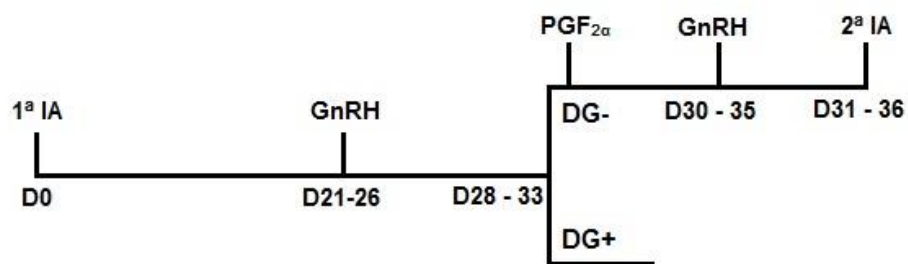
A precoce detecção de fêmeas em anestro é muito útil, principalmente para aquelas em que é feita uma pré-sincronização, de modo que, possam apresentar um CL, no início do tratamento propriamente dito. Animais acíclicos também apresentam baixas performances reprodutivas quando sujeitos a protocolos de IATF (Gümen, Guenther & Wiltbank, 2003). A detecção de uma elevada proporção de animais em anestro pode ser indicativo de um problema de manejo que necessita ser corrigido para se poder melhorar a fertilidade do efectivo.

Para além disto, a ultrassonografia é muito útil na selecção do protocolo de indução e sincronização de ovulação ideal para cada fêmea. Está comprovado que níveis elevados de progesterona durante um protocolo de IATF levam a um maior sucesso do mesmo (Vasconcelos, Silcox, Rosa, Pursley & Wiltbank, 1999). Deste modo, vacas saudáveis, mas sem um CL no início do protocolo, beneficiarão da inclusão de um dispositivo intravaginal de progesterona no tratamento a que vão ser sujeitas. Por seu turno, uma vaca saudável que apresente um CL não tirará grande benefício da inclusão do mesmo dispositivo, poupando-se assim, esse investimento. Para além de permitir escolher o protocolo mais adequado, a ultrassonografia permite também determinar o melhor momento para iniciar o tratamento (Carrière *et al.*, 2010).

Dado que o sucesso de um protocolo como o Ovsynch varia consoante a fase do ciclo éstrico em que a vaca se encontra no momento em que este começa, em explorações de pequena a média dimensão, onde o tratamento dos animais pode ser personalizado, pode determinar-se o melhor dia para o iniciar. Estando demonstrado que entre o dia 5 e 10 do ciclo éstrico é a melhor altura para iniciar um protocolo de IATF, uma vez que nesta fase as fêmeas apresentam, quer um folículo dominante (FD), quer um CL que perdurará durante o protocolo (Vasconcelos *et al.*, 1999; Moreira, de la Sota, Diaz & Thatcher, 2000), a rotina de algumas explorações pode ser adaptada para tentar fazer coincidir o início do protocolo de IATF com esta fase do ciclo.

Um diagnóstico de gestação precoce associado a estratégias que permitam reinseminar as vacas vazias o mais rápido possível é de uma grande importância num programa de controlo reprodutivo (Medan & Abd El-Aty, 2010; Quintela *et al.*, 2012). O DG quando realizado por ultrassonografia permite poupar vários dias quando comparado com a técnica de palpação transrectal (Fricke, 2002). Assim, com a utilização da ultrassonografia podem-se sincronizar as ondas foliculares de todas as fêmeas com uma GnRH logo entre 21 e os 26 dias após a primeira inseminação seguida de uma PGF<sub>2α</sub> 7 dias depois, apenas às que tiverem um DG negativo, associada a uma segunda GnRH 2 dias depois, com inseminação a tempo fixo no dia seguinte, poupando-se assim, vários dias em aberto (Fricke, Caraviello, Weigel & Welle, 2003; Cavalieri, Hepworth, Fitzpatrick, Shephard & Macmillan, 2006) (Figura 25).

Figura 25. Exemplo de protocolo ressincronização para IATF. Original do autor.



#### **4 TRABALHO EXPERIMENTAL**



#### 4.1 INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva tem um grande impacto na rentabilidade das explorações pecuárias, particularmente nas explorações de bovinos de leite. Ao longo das últimas décadas temos acompanhado uma diminuição dessa mesma eficácia, que nos últimos anos, atingiu um valor alarmante. Alguns dos problemas resultaram do aumento da dimensão das explorações, que levou a uma desvalorização do manejo individual das fêmeas. A selecção com base apenas nos caracteres produtivos conduziu a uma alteração do metabolismo das vacas que se reflectiu tanto na duração e intensidade dos sinais de cio, como nas taxas de concepção (Wiltbank *et al.*, 2006).

Hoje, os desafios maiores da reprodução de bovinos de leite prendem-se com as mediocres taxas de detecção de cios e de concepção (Pursley, Mee & Wiltbank, 1995). Para se fazer face ao problema da detecção de cios foram desenvolvidos métodos de sincronização de cios, através da administração de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , seguida de IA após detecção de cios, por um período de 7 dias. Esta concentração de cios contribuiu para uma melhoria substancial da eficácia da detecção dos mesmos, quando comparada com a simples observação diária de cios espontâneos. Com este método registaram-se taxas de gestação semelhantes às obtidas após IA em cios espontâneos. Contudo, este processo continuava a manter a necessidade de detecção de cios (Pursley *et al.*, 1997a; Pursley, Kosorok & Wiltbank, 1997b).

Posteriormente, foi desenvolvido um protocolo de sincronização de ovulações, o Ovsynch, com base na administração de GnRH e  $\text{PGF}_{2\alpha}$  de forma a possibilitar a IA em tempo fixo, uma vez que, concentrava as ovulações num período de 8 horas (Pursley *et al.*, 1995).

A utilização destes protocolos de sincronização para IATF veio a permitir diminuir o intervalo médio de tempo entre o parto e a 1ª IA e, aumentar a taxa de submissão, ao mesmo tempo que em algumas realidades, nomeadamente a americana, pode eliminar a necessidade da detecção de cios (Pursley *et al.*, 1997b).

Apesar das suas vantagens, o Ovsynch revelou alguns inconvenientes, principalmente quando o protocolo tem início numa fase muito precoce ou tardia do ciclo éstrico. Quando é iniciado numa fase muito precoce, normalmente não há nenhum folículo com capacidade de ovulação em resposta à primeira GnRH. Consequentemente, o FD que vai ovular após a administração da segunda GnRH libertará um oócito envelhecido, de fertilidade comprometida. Por outro lado, quando o Ovsynch tem início numa fase tardia do ciclo éstrico, a percentagem de fêmeas que revela ovulação prematura é bastante elevada, conduzindo a uma taxa de sincronização menor, uma vez que a luteólise fisiológica ocorre antes da administração da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , conduzindo assim a uma percentagem menor de fêmeas que ovula no momento adequado à fertilização após IATF (Vasconcelos *et al.*, 1999; Öztürk, Cirit, Baran & Ak, 2010).

Numa tentativa de minimizar a percentagem de vacas que se encontram nestas duas fases do ciclo éstrico, aquando do início do protocolo de sincronização de ovulações, foi desenvolvido um protocolo de pré-sincronização que tem demonstrado resultados bastantes satisfatórios, em termos de melhoria da taxa de concepção. Contudo, deve ser iniciado 36 dias antes da data da IA (Moreira *et al.*, 2001). Este protocolo consiste na dupla administração de PGF<sub>2α</sub>, com 14 dias de intervalo, iniciando-se o Ovsynch, 12 dias após a segunda PGF<sub>2α</sub>. Esta estratégia possibilita que uma maior percentagem de fêmeas ovule em resposta à primeira GnRH do Ovsynch e daí, que apresente um CL no momento da PGF<sub>2α</sub> subsequente (Thatcher, Moreira, Pancarci, Bartolome & Santos, 2002; Cavalieri *et al.*, 2006). Recentemente foi descrita uma versão do Ovsynch que inclui uma administração de PGF<sub>2α</sub>, 2 dias antes de se iniciar o Ovsynch, designada de Doublesynch, por sincronizar, quer a ovulação resultante da primeira administração de GnRH, quer a que sucede à segunda. Esta dupla sincronização permitiu obter melhores taxas de gestação tanto em vacas cíclicas, como em acíclicas, quando comparada com a versão clássica do Ovsynch (72.8% vs 29.8%). Para além disso, com esta dupla sincronização, os autores sugerem eliminar-se as fêmeas que se encontrariam na fase mais tardia do ciclo éstrico, aquando da administração da primeira GnRH. Com a administração da primeira PGF<sub>2α</sub> promove-se a lise do CL existente e é o CL resultante da 1ª ovulação que sofre o efeito da segunda PGF<sub>2α</sub>, evitando-se desta forma, a lise fisiológica do CL das vacas que estivessem numa fase mais tardia do ciclo éstrico no momento da primeira GnRH, obtendo-se deste modo, uma melhor taxa de sincronização (Öztürk *et al.*, 2010).

Contudo, demonstrou-se que níveis elevados de progesterona durante um protocolo Ovsynch originam melhores resultados (Bisinotto, Chebel & Santos, 2010; Carrière *et al.*, 2010). Do mesmo modo, a fase do ciclo éstrico em que se inicia o Ovsynch que conduz a melhores resultados é a que se situa entre a fase lútea precoce e o meio do ciclo (dia 5 a 10) (Vasconcelos *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2000). Bisinotto *et al.* (2010) ao verificarem que a ovulação do FD da primeira onda de crescimento folicular de um ciclo apresentava uma fertilidade inferior à do resultante da segunda onda de crescimento folicular sugeriram que esta diminuição da fertilidade poderia dever-se ao folículo em si ou ao ambiente endócrino próprio de cada onda. Uma vez que as concentrações de progesterona, que variam da primeira para a segunda onda folicular, são o principal factor diferenciador do ambiente endócrino das duas ondas, os autores concluíram que os FD que crescem sob o efeito de elevadas concentrações de progesterona, apresentam uma fertilidade superior.

Uma vez que durante o protocolo Doublesynch é administrada uma PGF<sub>2α</sub>, 2 dias antes de se iniciar o Ovsynch, nenhuma das duas condições anteriores se cumpre. Porém, está descrito que quando a primeira GnRH do Ovsynch origina uma ovulação, a probabilidade da fêmea ficar gestante é maior (Öztürk *et al.*, 2010). Randel, Lammoglia, Lewis, Neuendorff & Guthrie (1996) sugeriram que a administração de PGF<sub>2α</sub> potenciava os efeitos da

administração de GnRH para originar pulsos de LH e provocar ovulação, no entanto sem clarificar completamente o mecanismo pelo qual isto acontece. Assim, a primeira PGF<sub>2α</sub> do Doublesynch poderia aumentar a percentagem de vacas que ovulam em resposta à primeira GnRH e assim minimizar o número de vacas que iriam apresentar um FD com um oócito envelhecido no momento da segunda GnRH.

Nos últimos anos, o efeito do diâmetro do FD (pré-ovulatório), no momento da IA, sobre a fertilidade subsequente, tem sido alvo de vários estudos, graças à possibilidade de o medir, com bastante precisão, com recurso à ultrassonografia.

Vasconcelos *et al.* (1999) verificaram que, com vacas leiteiras sujeitas a um protocolo Ovsynch, as que apresentavam um FD com diâmetro superior a 18,2 mm, revelaram uma taxa de concepção inferior às restantes. Por seu turno, Lopes, Butler, Gilbert & Butler (2007) referiram que, após sujeitas ao mesmo protocolo, as vacas leiteiras que ficaram gestantes tinham um diâmetro médio do FD, no momento da IA, de 16,1 mm, enquanto que as negativas tinham um diâmetro médio de 14,5 mm. Sá Filho, Crespilho, Santos, Perry e Baruselli (2010) por seu lado, após sincronizarem ovulações em vacas Nelore e cruzadas de Nelore com Angus, com utilização de estradiol e dispositivos intravaginais de libertação de progesterona, concluíram que a presença de um FD de maiores dimensões no momento da IA, estava relacionada com maior exibição de cios, taxa de ovulação e taxa de concepção. Referiram também, que 11,1 mm era o diâmetro crítico acima do qual havia uma maior exibição de cios e melhores taxas de concepção. Lynch, Kenny, Childs & Diskin (2010) verificaram que novilhas de carne, após sincronização de cios com administração de PGF<sub>2α</sub> e inseminadas após detecção de cio, as que apresentaram um diâmetro do FD inferior a 14,1 mm, obtiveram uma taxa de concepção mais elevada que as que tinham um FD com diâmetro superior. Vasconcelos, Sartori, Oliveira, Guenther & Wiltbank (2001) concluíram que a ovulação de folículos menores (11,4 mm  $\pm$  0,22 mm vs 14,47 mm  $\pm$  0,39 mm) originava uma taxa de concepção inferior, possivelmente, porque FD menores, para além de produzirem menores quantidades de estradiol no momento da IA, originavam também CL de menores dimensões que por sua vez iriam produzir níveis reduzidos de progesterona. De forma semelhante, Moreira *et al.* (2000) referiram que o diâmetro do FD influenciava a concentração de progesterona, durante o período pós-ovulatório, de uma forma linear. Por seu turno, Simões *et al.* (2012) verificaram que, em vacas Nelore, os FD com diâmetro superior a 9 mm apresentavam mais receptores para LH e, assim, tinham maiores probabilidades de ovular. Já Perry, Smith, Roberts, MacNeil & Geary (2006) relataram que, em novilhas de carne, existe um presumível diâmetro do FD (12,8 mm) para o qual se obtém uma taxa de gestação máxima (68,0  $\pm$  4,9 %) e que os FD com diâmetros inferiores a 10,7 mm e superiores a 15,7 mm têm uma probabilidade inferior de originar uma gestação quando comparados com os de 12,8 mm. Postularam que, a competência do oócito ovulado, a produção de progesterona pelo CL pós-IA e o ambiente uterino pós-IA poderiam estar

envolvidos na redução da taxa de gestação, por ovulação destes FD com diâmetros inferiores a 10,7 mm ou superiores a 15,7 mm. Referiram também que novilhas que ovularam espontaneamente tinham FD  $0,6 \pm 0,3$  mm maiores que os de novilhas sujeitas ao protocolo de sincronização de ovulação CO-Synch.

O crescimento prolongado de um folículo ocorre sob o efeito de concentrações basais de progesterona, que originam uma fase de dominância mais longa, graças a um período mais longo de pulsos frequentes de LH. Fêmeas com este tipo de folículos apresentam uma taxa de concepção reduzida (Wiltbank *et al.*, 2011). A taxa de fertilização de oócitos provenientes destes folículos não é afectada, contudo a percentagem de embriões que se desenvolvem, para além do dia 16, é bastante reduzida (Ahmad *et al.*, 1996).

Vacas de alta produção, quando inseminadas após detecção do cio, podem também ovular FD maiores que o normal e de fertilidade comprometida. Isto ocorre devido ao elevado metabolismo hepático das hormonas esteróides, que dá origem a concentrações de progesterona abaixo do que seria necessário para suprimir a frequência pulsátil de LH durante o diestro e, ao ser metabolizado o estradiol produzido pelo FD, este tem de crescer ainda mais, para garantir uma concentração de estradiol, necessária à indução do pico pré-ovulatório das gonadotrofinas (Bleach, Glencross & Knight, 2004; Wiltbank *et al.*, 2006; Wiltbank *et al.*, 2011). Para além da elevação da taxa de metabolização hepática das hormonas esteróides, Endo, Nagai, Tanaka & Kamomae (2012) especularam que a excreção através do leite pode, também, influenciar negativamente os valores séricos de progesterona. A progesterona, pelo seu papel crucial em proporcionar um ambiente uterino ideal, onde o embrião se deverá desenvolver, através das suas acções ao nível do endométrio, e consequentemente, na composição do histotrofo, está fortemente relacionada com a capacidade dos embriões se desenvolverem e produzirem suficiente interferão tau, de modo a para impedir a luteólise (Mann & Lamming, 1999; Lonergan, 2011).

Lynch *et al.* (2010) relataram que a capacidade de produção de progesterona pelo CL, na fase lútea precoce, está correlacionada com a fertilidade e que, concentrações elevadas de progesterona, no dia 7 após IA, estão fortemente associadas à capacidade de sobrevivência do embrião. McNeill, Diskin, Sreenan & Morris (2006) descreveram uma associação linear positiva entre os valores de progesterona na fase lútea precoce (dia 4 a dia 6 após a IA) e a probabilidade de sobrevivência embrionária. Concluíram então, que níveis sub-óptimos de progesterona durante a fase lútea precoce ou um atraso no momento em que os valores ideais de progesterona são atingidos, afectam de forma negativa a viabilidade embrionária.

Mann, Fray & Lamming (2006) após compararem a suplementação de progesterona em dois momentos, um numa fase mais precoce pós-IA (5 a 9 dias) e outro, numa mais tardia (12 a 16 dias), chegaram à conclusão que o momento da subida e os valores de progesterona pós-IA influenciavam as taxas de gestação. Com este estudo ficou demonstrado que fêmeas bovinas que têm valores de progesterona mais elevados numa fase mais precoce do diestro

(dia 5 a 9) e não numa fase mais tardia, apresentavam embriões mais desenvolvidos, com um trofoblasto maior e, conseqüente, produção de interferão tau superior. Já Shelton *et al.* (1990) e Butler *et al.* (1996), citados por Butler (2003) também verificaram que um menor aumento das concentrações de progesterona durante os dias 4 e 5 pós IA estava relacionado com fertilidade reduzida. Por seu turno, Stronge *et al.* (2005) após terem registado uma relação linear positiva entre os valores de progesterona entre os dias 5 e 7 do ciclo éstrico e a sobrevivência embrionária, concluíram que tanto concentrações de progesterona muito baixas, como as muito elevadas, do dia 4 ao 7 pós-IA, bem como, um atraso no aumento das concentrações de progesterona durante este intervalo de tempo, estavam negativamente relacionados com a taxa de sobrevivência embrionária. Apesar de concentrações excessivas de progesterona estarem associadas a reduzida sobrevivência embrionária, são as concentrações demasiado reduzidas de progesterona que constituem o problema mais comum, hoje em dia, das fêmeas bovinas leiteiras.

Ginther (1995a) afirmou que o peso e a área lúteos aumentam a um ritmo coincidente com as concentrações periféricas de progesterona, durante os primeiros 8 dias do ciclo. Já Sprecher, Nebel & Whitman (1989) e Kastelic, Bergfelt & Ginther (1990) concluíram que a avaliação ultrassonográfica do CL é uma alternativa viável à determinação dos níveis periféricos de progesterona, para avaliação da função lútea em novilhas Holstein. Já Siqueira *et al.* (2009a) comprovaram que a área lútea e a concentração plasmática de progesterona estão altamente correlacionados em novilhas, confirmando que o aumento da área lútea, histologicamente caracterizado por hiperplasia e hipertrofia das células esteroideogénicas do CL, resulta num aumento da produção de progesterona pelo CL e num aumento das suas concentrações plasmáticas.

Por seu lado, Lopes da Costa (1995) declarou que a ecografia constitui uma metodologia eficiente na identificação e diferenciação de estruturas ováricas, sendo a área do tecido lúteo o parâmetro que mais se correlaciona com a P4 periférica.

Assim, foi objectivo do presente trabalho, estudar-se a dinâmica ovárica resultante de cada um dos protocolos de IATF seleccionados, de maneira a tentar detectar diferenças nas dimensões das estruturas ováricas que justificassem a grande diferença de resultados relatada por Öztürk *et al.* (2010). De forma semelhante, pretendeu-se também estudar, em vacas Holstein, se haveria uma relação entre as dimensões do FD e do CL em diferentes dias pós IA ou entre as dimensões dos FD e CL e a probabilidade das vacas ficarem gestantes.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Animais e meio ambiente

O trabalho experimental foi realizado na Casa Agrícola Policarpo, Cabeço Verde, Moita, distrito de Setúbal, entre Dezembro de 2012 e Junho de 2013.

A exploração tem uma área de 9 hectares no total, dos quais 1,5 são instalações pecuárias e o restante de cultivo de prados, para alimentação de vitelas de 6-12 meses. O efectivo é composto por um touro, 417 fêmeas, das quais 225 em lactação, 22 secas, 108 novilhas e 62 vitelas, maioritariamente da raça Frísia Holstein. As vacas em produção são ordenhadas três vezes por dia e têm uma produção de leite média aos 305 dias de 10500 litros. A alimentação é distribuída a partir de *unifeed*, com percentagens de silagem de milho, erva, palha e concentrado que variam consoante o estado produtivo dos animais. Para este estudo foram utilizadas 45 vacas, múltíparas (n=21) e primíparas (n=24), que para poder participar tiveram que cumprir com uma série de requisitos: não podiam ter história de retenção placentária, nem de metrite puerperal; não podiam ter tido um parto distócico, nem gemelar; tinham de ter entre 40 a 100 dias de paridas e sem qualquer IA na presente lactação (1ª IA). Antes de serem submetidas a qualquer um dos protocolos hormonais, as vacas foram sujeitas a um exame ginecológico para excluir animais que apresentassem qualquer tipo de patologia reprodutiva, incluindo anestro, por este tipo de fêmeas apresentarem uma fertilidade bastante reduzida (Gümen *et al.*, 2003). Durante este exame, foi avaliada a condição corporal (CC) e as vacas que apresentavam uma CC inferior a 2,5 (escala de 1 a 5) foram também excluídas do estudo por poderem colocar em risco os resultados do ensaio (Mulligan, O'Grady, Rice & Doherty, 2006). Ao longo do estudo foram eliminados alguns animais: no grupo da PG foram eliminadas 4 vacas que não foram detectadas em cio nos 7 dias após a administração do fármaco e duas, por apresentarem corrimento com pús no dia do cio; no grupo Ovsynch, uma vaca estava em anestro no dia da inseminação, duas fizeram cio precoce (antes do dia da PG) e, uma com corrimento purulento no dia da IA; no grupo Doublesynch, três vacas que apresentaram corrimento com pús no dia da IA.

### 4.2.2 Delineamento experimental

Uma vez aceites no presente ensaio, as vacas foram distribuídas por cada um de 3 grupos, à medida que estas eram examinadas por volta dos 35 dias pós parto, sendo que a 1ª foi inserida no grupo prostaglandina (G-PG), a 2ª no grupo Ovsynch (G-OVS), a 3ª no grupo Doublesynch (G-DOVS), a 4ª novamente no G-PG e assim sucessivamente. Às vacas pertencentes ao G-PG foram administradas 150 microgramas ( $\mu\text{g}$ ) por via intramuscular (im), em dose única, de um análogo da  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Dexcloprostenol, GESTAVET-PROST,

Laboratórios Hipra, Espanha), após palpação transrectal de um CL maduro, seguida de detecção de cios nos 7 dias seguintes e, foram inseminadas segundo a regra AM/PM (Figura 26). Sucintamente, consiste em inseminar de manhã, as vacas detectadas em cio durante a tarde ou noite do dia anterior e, à tarde/noite as que foram detectadas no próprio dia de manhã (Trimberger & Davis, 1943). As vacas do G-OVS foram sujeitas a um protocolo de IATF, o Ovsynch (Pursley *et al.*, 1995), administrando-se 200 µg, via im, numa dose única de GnRH [Gonadorelina, FERTAGYL, MSD Animal Health (Intervet Portugal – Saúde Animal, Lda), Portugal] e 150 microgramas (µg) por via im em dose única de um análogo da PGF<sub>2α</sub> (Dexcloprostenol, GESTAVET-PROST, Laboratórios Hipra, Espanha), 7 dias depois, seguida de nova administração de GnRH [Gonadorelina, FERTAGYL, MSD Animal Health (Intervet Portugal – Saúde Animal, Lda), Portugal] após 2 dias. A IA foi realizada 16 a 18 horas depois da segunda administração de GnRH (Figura 27). Note-se que a dose de GnRH administrada foi sensivelmente metade da dose recomendada pelo fabricante. Esta escolha foi feita com base na experiência profissional com o medicamento e suportada pelos trabalhos de Fricke, Guenther & Wiltbank (1998) que defenderam que a redução da dose de GnRH para metade dos valores indicados não interferia com a fertilidade final do protocolo. As vacas do G-DOVS foram também estas submetidas a um protocolo de IATF desta feita por via de uma variação do Ovsynch, o Doublesynch (Öztürk *et al.* 2010), cujo calendário se encontra esquematizado na Figura 28.

Figura 26. Esquema dos procedimentos do G-PG. Original do autor.



Figura 27. Esquema dos procedimentos do G-OVS. Original do autor.

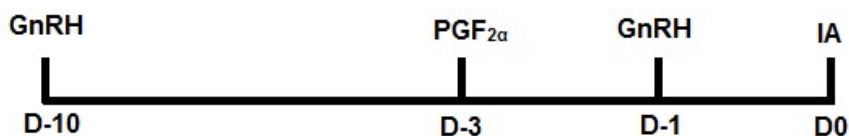
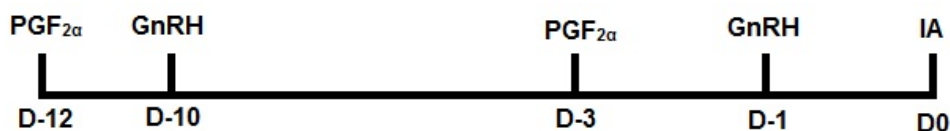


Figura 28. Esquema dos procedimentos do G-DOVS. Original do autor.



#### 4.2.3 Registo de dados

Os dados relativos às estruturas ováricas (área lútea dos CL e diâmetro máximo dos FD) foram obtidos por ultrassonografia (Ultrascan 900, AMI, Canadá) (Figura 29) com recurso a uma sonda linear transrectal de 5 MHz de frequência. Conforme esquematizado na Figura 30 considerou-se o dia da IA, como dia de referência, ou seja dia 0. Foram realizados exames ultrassonográficos para avaliar o diâmetro máximo dos FD no dia 0 (Figura 31) e as áreas lúteas dos CL aos dias 7, 14 e 21, que no caso de CL maciços é a área total do CL e nos CL cavitários, consiste na área do CL menos a área da cavidade (Figuras 32 e 33). A confirmação do desaparecimento de um FD que era identificável ao dia 0 e a presença de um CL no mesmo ovário no dia 7, foi utilizado como confirmação da ovulação. O DG foi feito por ultrassonografia ao dia 30 e repetido a dia 50 por palpação transrectal para confirmação e detecção de casos de mortalidade embrionária.

Figura 29. Ecógrafo Ultrascan 900, AMI, Canadá



Figura 30. Esquema da rotina de ultrassonografias. Original do autor

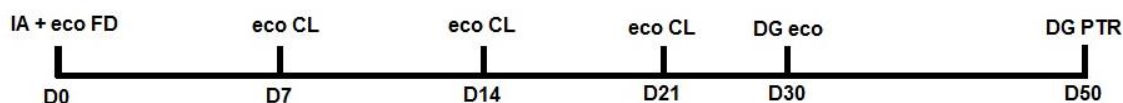


Figura 31. Imagem ultrassonográfica da medição do diâmetro do FD no dia da IA. Original do autor.





Figura 32. Imagem ultrassonográfica da medição da área total do CL no dia 7. Original do autor.

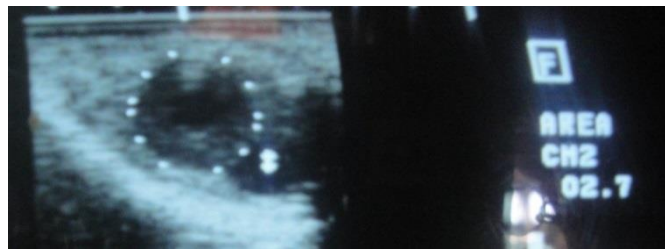
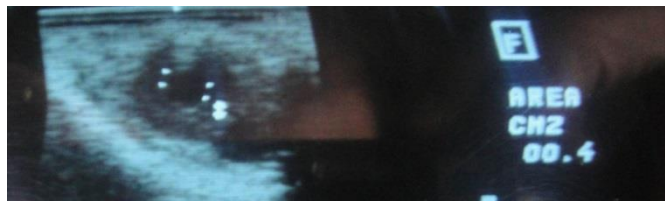


Figura 33. Imagem ultrassonográfica da medição da área da cavidade de um CL no dia 7. Original do autor.



#### 4.2.4 Detecção de cios e IA

No G-PG, os cios foram detectados por observação visual, em dois períodos diários de 30 minutos: um, depois da ordenha da manhã e outro, depois da ordenha da tarde. As IA foram todas realizadas pelo mesmo técnico de forma a minimizar variações de fertilidade introduzidas por múltiplos inseminadores. Foi utilizado sêmen descongelado de vários touros de fertilidade comprovada.

#### 4.2.5 Análise estatística

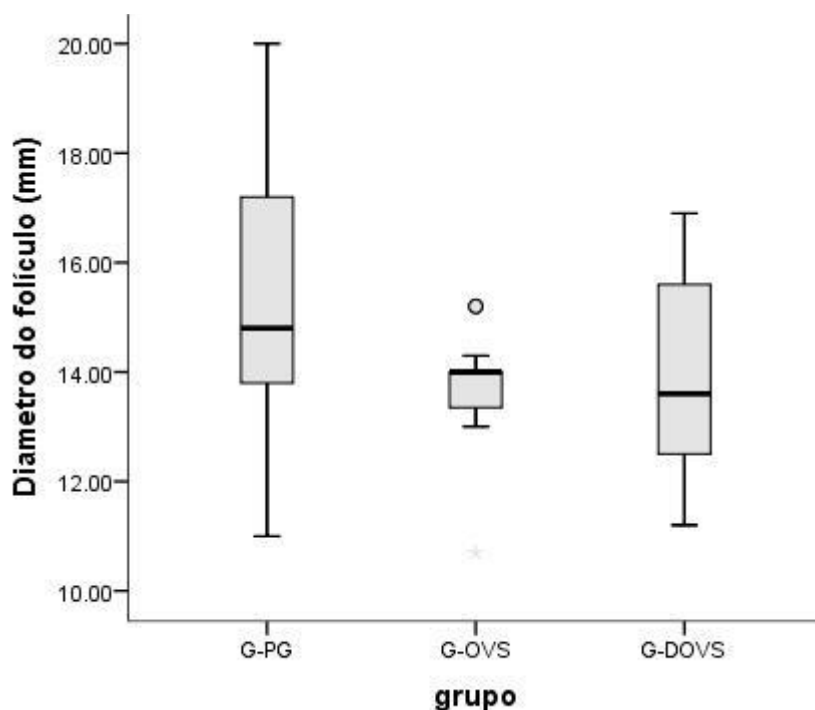
Os diferentes dados que foram recolhidos ao longo do presente ensaio foram armazenados e tratados no programa informático Microsoft Office Excel 2010, a partir do qual foram elaboradas algumas das tabelas. Depois de concluída a base de dados, procedeu-se à sua análise com o auxílio do programa IBM SPSS Statistics 20 para Windows. Ao nível da estatística descritiva foram calculados: média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo (ver anexos: pág. 84) para as variáveis “Diâmetro do Folículo (mm)” (Gráfico 1), “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)” (Gráfico 2), “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)” (Gráfico 3), “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” (Gráfico 4) e “Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)” (Gráfico 5). Após se ter aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk constatou-se que, das variáveis atrás referidas apenas a “Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)”, apresentava uma distribuição normal. Posto isto, os testes utilizados na avaliação da associação entre variáveis foram não paramétricos. Os testes estatísticos realizados foram então, o teste para amostras independentes Kruskal-Wallis

para verificar se a distribuição das variáveis “Diâmetro do Folículo (mm)”, “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)” e “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” era a mesma para os diferentes grupos (G-PG, G-OVS e G-DOVS). Como a variável “Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)” apresentou uma distribuição normal, foi-lhe aplicada o teste ANOVA para análise da variância entre os diferentes grupos. Realizou-se também o teste da Correlação de Spearman entre as diferentes variáveis atrás referidas para detecção de qualquer correlação entre as distribuições das diferentes variáveis. Por fim, foi realizado o teste de Mann-Whitney U para verificar se a distribuição das variáveis “Diâmetro do Folículo (mm)”, “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)” e “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” era a mesma entre os grupos DG positivo (n=12) e DG negativo (n=33). A variável “Área do Corpo Lúteo-D21 (cm<sup>2</sup>)” acabou por não ser trabalhada estatisticamente por falta de dimensão da amostra, uma vez que às várias fêmeas que exibiram cio antes do dia 21 após a 1ª IA, não foi realizada a ultrasonografia para medição das estruturas.

#### 4.3 RESULTADOS

Nos diferentes grupos as taxas de fertilidade alcançadas foram as seguintes: G-PG 40% (6/15), G-OVS 13,3% (2/15) e G-DOVS 20% (3/15).

Gráfico 1. Distribuição da variável “Diâmetro do Folículo (mm)” entre os diferentes grupos.



As linhas grossas representam a mediana de cada grupo, dentro dos rectângulos encontram-se os segundo e terceiro quartis e fora dos rectângulos o primeiro e quarto quartis.

O gráfico 1 ilustra a distribuição dos valores do diâmetro dos folículos nos diferentes grupos. O G-PG apresenta uma maior variação do diâmetro folicular, ao mesmo tempo que o seu diâmetro médio é maior que o dos restantes grupos. Dos três grupos, o G-OVS é o que apresenta uma menor variação do diâmetro folicular tendo sido, contudo, possível observar um valor *outlier* de um folículo com um diâmetro acima do restante grupo. Para a variável “Diâmetro do Folículo (mm)”, o teste Kruskal-Wallis, usado para avaliar se a distribuição de variáveis era a mesma para os diferentes grupos, detectou diferenças significativas entre os grupos, uma vez que se obteve um valor de p de 0,038. Verificando-se assim, diferenças no diâmetro do FD entre as fêmeas dos diferentes grupos. Após uma análise dos grupos por pares, ou seja entre o G-PG e o G-OVS; entre o G-PG e o G-DOVS e entre o G-OVS e o G-DOVS, verificou-se que a distribuição desta variável no G-PG apresentava diferenças significativas, tanto para o G-OVS ( $p=0.017$ ), como para o G-DOVS ( $p=0,046$ ). Porém, entre o G-OVS e o G-DOVS, os dados não evidenciaram a existência de qualquer diferença entre as distribuições ( $p=0,701$ ) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Análise das diferenças da distribuição da variável “Diâmetro do Folículo (mm)” nos diferentes grupos organizados por pares.

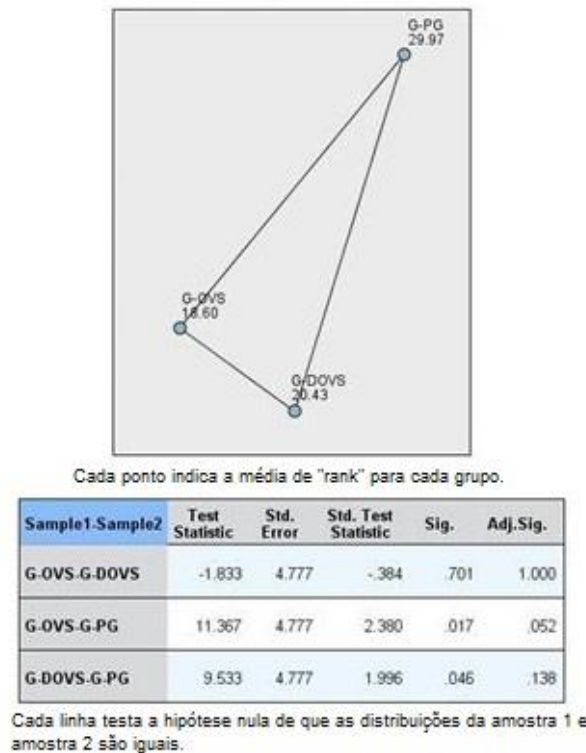
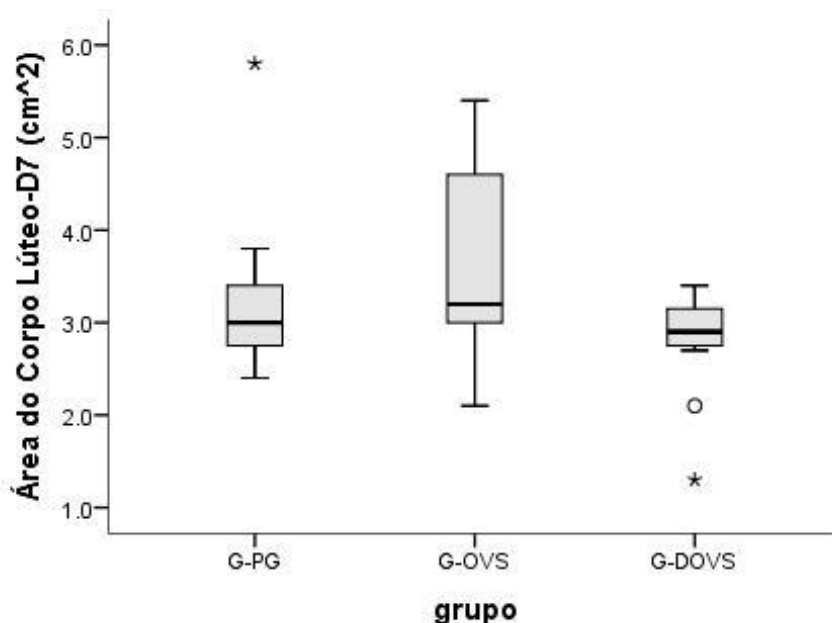


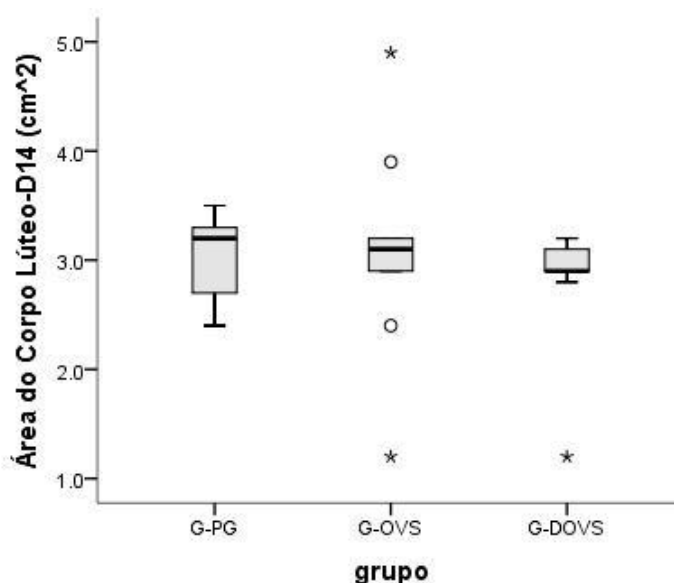
Gráfico 3. Distribuição da variável "Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)" entre os diferentes grupos.



As linhas grossas representam a mediana de cada grupo, dentro dos rectângulos encontram-se os segundo e terceiro quartis e fora dos rectângulos o primeiro e quarto quartis.

O gráfico 3 ilustra a distribuição do valor da área do corpo lúteo ao dia 7. O G-OVS apresentou uma maior dispersão dos valores e uma média ligeiramente superior aos restantes grupos. O G-PG tem um *outlier* de valor acima dos restantes membros do grupo e o G-DOVS apresenta dois, com valores inferiores. O teste Kruskal-Wallis, não revelou diferenças significativas entre os diferentes grupos, para um intervalo de confiança de 95% uma vez que, o valor de p foi 0,143.

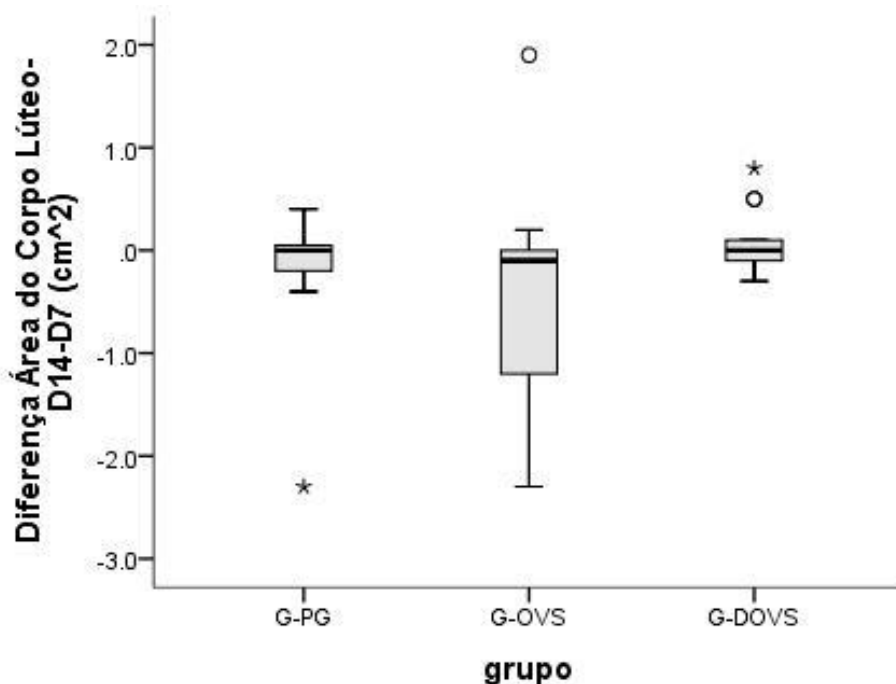
Gráfico 4. Distribuição da variável "Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)" entre os diferentes grupos.



As linhas grossas representam a mediana de cada grupo, dentro dos rectângulos encontram-se os segundo e terceiro quartis e fora dos rectângulos o primeiro e quarto quartis.

O gráfico 4 ilustra a distribuição do valor da área do corpo lúteo ao dia 14. Neste caso, foi novamente o G-PG que mostrou uma maior dispersão de resultados. O G-OVS exibiu 4 *outliers*, dois de valores abaixo do restante grupo e 2 de valores excessivamente elevados. Já o G-DOVS apresentou um, de valor inferior ao restante grupo. Porém, o teste Kruskal-Wallis, não revelou diferenças significativas entre os diferentes grupos, uma vez que, o valor de p foi 0,329.

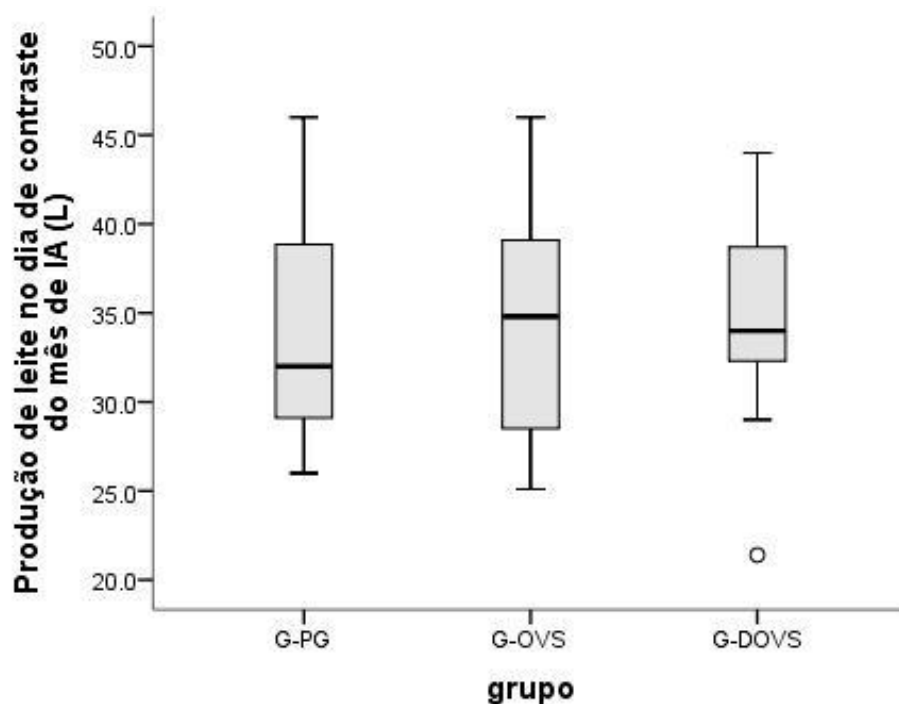
Gráfico 5. Distribuição da variável "Diferença da Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)" entre os diferentes grupos.



As linhas grossas representam a mediana de cada grupo, dentro dos rectângulos encontram-se os segundo e terceiro quartis e fora dos rectângulos o primeiro e quarto quartis.

O gráfico 5 ilustra a distribuição do valor da diferença da área do CL do dia 7 ao dia 14. O G-OVS ostentou uma maior dispersão de valores e um *outlier* de valor superior ao restante grupo. O G-DOVS exibiu 2 *outliers* de valor superior ao restante grupo e no G-PG verificou-se a presença de um *outlier* de valor inferior aos restantes. A média dos valores foi praticamente zero para todos os grupos. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos uma vez que o valor de p do teste Kruskal-Wallis foi 0,146.

Gráfico 6. Distribuição da variável "Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L) entre os diferentes grupos."



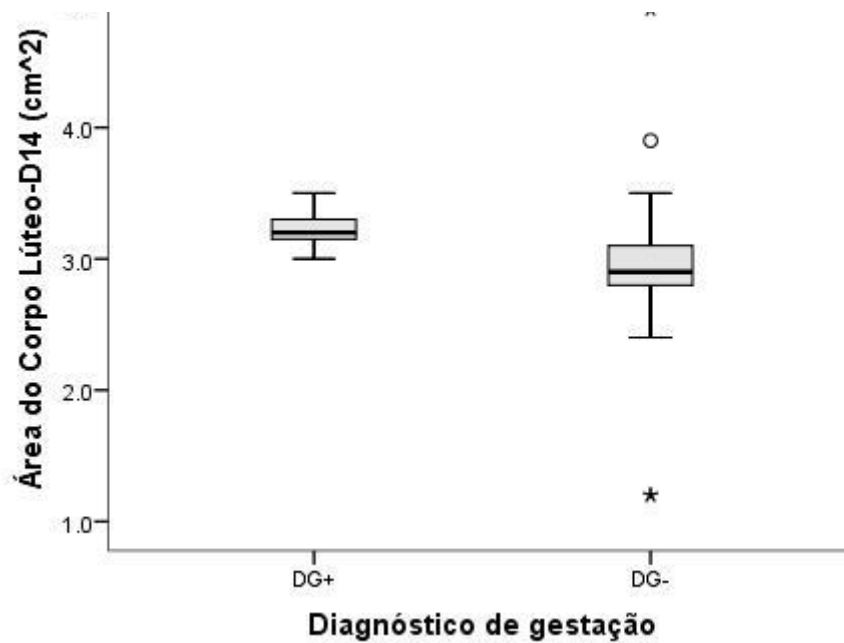
As linhas grossas representam a mediana de cada grupo, dentro dos rectângulos encontram-se os segundo e terceiro quartis e fora dos rectângulos o primeiro e quarto quartis.

No gráfico 6 estão representados os valores da produção de leite no dia de contraste do mês de IA. A dispersão de valores foi semelhante entre os diferentes grupos e a média foi sensivelmente superior no G-OVS. Contudo, quando utilizado o teste ANOVA para estudo da diferença entre as médias dos diferentes grupos, também para esta variável, os dados não evidenciaram diferenças significativas entre os mesmos ( $p=0,953$ ).

Quanto à correlação entre as diferentes variáveis, avaliada pela correlação de Spearman, os dados do presente trabalho não evidenciaram qualquer correlação entre a variável "Diâmetro do Folículo (mm)" e as variáveis "Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)", "Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)", "Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)" e "Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)".

Quando comparadas através do teste de Mann-Whitney U, as distribuições das variáveis "Diâmetro do Folículo (mm)", "Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)" e "Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)" revelaram não haver diferenças entre os dois grupos (DG+ e DG-). A excepção foi a variável "Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)" para a qual se detectou diferença significativa entre a distribuição nos dois grupos (Gráfico 7).

Gráfico 7. Distribuição da variável “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)” entre os grupos DG+ e DG-.



As linhas grossas representam a mediana de cada grupo, dentro dos rectângulos encontram-se os segundo e terceiro quartis e fora dos rectângulos o primeiro e quarto quartis.

## 4.4 DISCUSSÃO

### 4.4.1 Relação entre a variável “Diâmetro do Folículo (mm)” e os diferentes grupos

No presente estudo, os dados evidenciaram uma relação entre a distribuição da variável “Diâmetro do Folículo (mm)” e os diferentes grupos, sendo que os FD das vacas do G-PG apresentaram diâmetros superiores aos dos das vacas dos grupos G-OVS e G-DOVS. Isto está em concordância com os achados de Perry *et al.* (2006) que relataram que FD de novilhas que ovularam espontaneamente seriam maiores que os FD de novilhas sujeitas a um protocolo de sincronização de ovulação, CO-Synch. O autor deste estudo sugere a hipótese de o FD de vacas sujeitas a protocolos de sincronização de ovulação ovularem com um diâmetro inferior, em virtude de, nestes protocolos, o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas que origina o processo de ovulação ser induzido por uma administração de GnRH e não, por um pulso endógeno de GnRH, em resposta aos níveis circulantes de estrogénios, como nas vacas que ovulam espontaneamente. Assim, os FD das vacas do grupo G-PG necessitariam de atingir um certo diâmetro para originar a ovulação, coisa que os FD dos grupos G-OVS e G-DOVS não necessitam. Esta hipótese está de acordo com os achados de Lopez, Satter e Wiltbank (2004) que referiram que vacas de alta produção ovulavam folículos maiores como consequência de uma maior metabolização do estradiol, tornando-se assim necessários folículos com diâmetros superiores (mais estradiol) para induzir a ovulação. No presente estudo, os níveis de produção leiteira entre os diferentes grupos foram iguais, mas nos grupos com ovulação induzida a administração de GnRH fez com que os folículos ovulados não tivessem que atingir as mesmas dimensões que os das vacas do G-PG.

Já entre os grupos G-OVS e G-DOVS do presente trabalho, os dados obtidos não permitiram detectar qualquer diferença entre os diâmetros dos FD das vacas dos diferentes grupos que justificassem as diferenças de fertilidade obtidas por Öztürk *et al.* (2010). Uma vez que uma das vantagens descritas para o Doublesynch era a diminuição do número de vacas que não respondiam à primeira GnRH e que, tal como Vasconcelos *et al.* (1999) relataram, ao não responderem à primeira GnRH ovulariam um FD de maiores dimensões e libertariam um ócito envelhecido, a não detecção de uma diferença significativa entre as dimensões dos FD destes dois grupos foi inesperada.

Dado que os grupos tinham apenas 15 vacas e que, estas diferenças apenas se verificariam nas fêmeas que estivessem no início do ciclo éstrico (dia 0 a 4) quando recebessem a primeira GnRH do protocolo, é possível que a ausência de diferenças significativas tenha sido devida à pequena dimensão da amostra.



#### 4.4.2 Relação entre as variáveis “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)” e “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” e os diferentes grupos

Apesar de terem sido registadas diferenças entre os grupos quanto à variável “Diâmetro do Folículo (mm)”, o mesmo não se verificou com as variáveis “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)” e “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)”. Está comprovado o importante papel da LH como factor determinante do desenvolvimento de um CL de dimensões normais, tanto no período pré-ovulatório como no pós-ovulatório. Tem a ver com o seu papel na maturação do FD e na sua contribuição para o desenvolvimento de células lúteas pequenas em lúteas grandes (Quintal-Franco *et al.*, 1999). O autor sugere que as suas concentrações, assim como as de GH (Lucy *et al.*, 1995) podem ser tão ou mais importantes para a taxa de crescimento e dimensões do CL, como as dimensões do FD que lhe deu origem. Esta hipótese é suportada pelos achados de Snook *et al.* (1969) citados por Milvae, Hinckley e Carlson (1996) que demonstraram que novilhas às quais foi administrado soro anti LH apresentaram um CL com um tamanho e conteúdo de P4 diminuídos.

#### 4.4.3 Correlação entre as variáveis “Diâmetro do Folículo (mm)” e “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)”, “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” e “Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)”

No presente estudo, os dados não evidenciaram qualquer correlação entre a distribuição da variável “Diâmetro do Folículo (mm)” e as das variáveis “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)”, “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” e “Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)”.

Entre a variável “Diâmetro do Folículo (mm)” e as das variáveis “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)”, os resultados agora obtidos estão em desacordo com os apresentados por Vasconcelos *et al.* (2001). Contudo o autor já sugeriu a hipótese de que o ambiente endócrino de cada vaca pode ter uma influência tão ou mais notória sobre as dimensões do CL, que o diâmetro do FD que dá origem a esse mesmo CL. Uma possível explicação para a diferença de resultados obtidos entre o presente estudo e os de Vasconcelos *et al.* (2001) poderá dever-se ao facto de neste último, alguns dos FD menores (11,4 mm  $\pm$  0,22 mm) poderiam não apresentar total funcionalidade, sendo assim incapazes de responder plenamente ao pico pré-ovulatório de gonadotrofinas e, aos níveis de LH no período pós-ovulatório, e assim, originar CL de dimensões semelhantes aos resultantes de FD de maiores dimensões. Como no presente estudo foram raros (n=2) os FD de dimensões inferiores a 12 mm de diâmetro, este problema de FD de dimensões excessivamente pequenas não se colocou. Esta hipótese está de acordo com os achados de Sá Filho *et al.* (2010) que estabeleceram 11,1 mm como diâmetro folicular crítico, acima do qual se obtinham melhores taxas de gestação.

No entanto, não se pode eliminar a hipótese da falta de experiência do operador em realizar medições de áreas do corpo lúteo, poder, de certo modo, ter influenciado os resultados, impossibilitando deste modo a detecção de uma possível correlação entre as variáveis. Este problema colocou-se principalmente na medição do CL ao dia 7, uma vez que os CL neste dia podiam ainda encontrar-se num estado de corpo hemorrágico que é particularmente difícil de delimitar ultrassonograficamente quando em comparação com os CL dos dias subsequentes (Hanzen, Pieterse, Scenczi & Drost, 2000).

Quanto à correlação entre a variável “Diâmetro do Folículo (mm)” e a “Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)”, os dados não evidenciaram qualquer correlação. O objectivo de testar esta correlação foi o de tentar perceber se, tal como Lopez *et al.* (2004) descreveram, haveria alguma associação entre vacas com maiores produções, e consequentemente maior ingestão de matéria seca, assim como uma maior metabolização de hormonas esteróides como reflexo de um maior fluxo sanguíneo hepático e, as vacas que ovulavam FD de maiores dimensões. Depois de trabalhados os dados da totalidade das vacas, o autor sugere que a ausência de correlação pode ter explicação no facto de os FD que ovulam iatrogénicamente após administração de GnRH não necessitarem de crescer e sintetizar estrogénios da mesma maneira que os FD de vacas que ovulam espontaneamente. Contudo, mesmo quando avaliadas apenas as vacas do grupo G-PG que ovularam sem administração de GnRH, também não foi detectada qualquer correlação. Assim, o autor sugere que tal se pode ficar a dever ao facto de, uma só medição da produção diária de leite, no dia do contraste, pode não ser suficiente para caracterizar a produção de cada vaca e a respectiva ingestão de matéria seca e, por sua vez, o fluxo sanguíneo hepático responsável pela metabolização de hormonas esteróides. Seria vantajoso realizar um outro estudo que tentasse correlacionar estas duas variáveis, mas com meios de caracterização da produção de cada fêmea, mais abrangentes e precisos.

4.4.4 Relação entre as variáveis “Diâmetro do Folículo (mm)”, “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)” e “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” e os grupos DG+ e DG-

No presente estudo, os dados não evidenciaram qualquer diferença entre a distribuição das variáveis “Diâmetro do Folículo (mm)”, “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)” e “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” e os grupos DG+ e DG-.

O facto de não terem sido detectadas diferenças na distribuição da variável “Diâmetro do Folículo (mm)” entre os grupos DG+ e DG- está em desacordo com Vasconcelos *et al.* (1999), Lopes *et al.* (2007) e Lynch *et al.* (2010). O autor sugere que esta ausência de concordância se deve ao facto de os dados dos diferentes grupos de tratamento terem sido analisados em conjunto para esta variável (DG) por exiguidade da amostra. Assim, para

diferentes protocolos hormonais de sincronização de ovulação, podem haver também diferentes diâmetros foliculares, ideais para se obter as taxas de gestação desejadas e, quando avaliados em conjuntos essas diferenças entre protocolos podem “mascarar” as diferenças do diâmetro dos FD entre os animais positivos e negativos ao DG. Por isso, teria sido vantajosa a realização de um ensaio com um maior número de fêmeas ou com vacas sujeitas apenas a um protocolo, de maneira a poder comparar-se mais assertivamente as dimensões foliculares com o resultado do DG.

O facto de não terem sido detectadas diferenças na distribuição das variáveis “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)” e “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” entre os grupos DG+ e DG- poderá ter ficado a dever-se a uma multiplicidade de factores. Por um lado, a dimensão do CL apesar de servir de indicação da possível capacidade esteroidogénica do CL (Kastelic *et al.*, 1990) não tem em conta outros factores que podem influenciar essa capacidade de síntese, como os níveis de LH (Peters *et al.*, 1994; Quintal-Franco *et al.*, 1999; Rekawiecki, Nowik & Kotwica, 2005), Prostaglandina E2 (PGE2) (Rekawiecki *et al.*, 2005), IGF's (Sauerwein, Miyamoto, Günther, Meyer & Schams, 1992) e GH (Schemm, Deaver, Griel & Muller, 1990; Lucy *et al.*, 1995)

Sabe-se que a LH e a PGE2 estimulam a secreção de P4 através do aumento da expressão dos genes da STAR (proteína reguladora da esteróidogénese aguda), do citocromo p450 e da 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase) e respectivas proteínas, que em conjunto regulam a taxa de conversão do colesterol em P4 (Rekawiecki *et al.*, 2005).

A IGF pensa-se actuar como um sinal autócrino que aumenta os receptores para a LH e consequentemente, a produção de P4. Já a GH, dado que muitas das suas funções são mediadas por elementos da família das IGF's, crê-se actuar por via indirecta pelo aumento da actividade destes (Schemm *et al.*, 1990).

No entanto, Robinson *et al.* (2006) após os seus trabalhos em vacas leiteiras que não se encontravam a produzir leite, concluíram que não era o ambiente pós-ovulatório de LH que regulava a síntese de P4. Chegaram a tal conclusão ao comparem os perfis de LH após a IA entre vacas com uma produção normal e vacas com uma produção atrasada de P4. Os mesmos autores sugeriram então que talvez o ambiente endócrino pré-ovulatório pudesse ter alguma importância no futuro desenvolvimento do CL e sua capacidade esteroidogénica. Esta hipótese é suportada pelos trabalhos de Mee, Stevenson, Alexander e Sasser (1993) que demonstraram que vacas às quais foi administrada GnRH no momento do cio apresentaram maiores produções de P4 no período pós ovulatório assim como, maiores taxas de concepção e um ratio entre células lúteas grandes e pequenas aumentado. Assim, é legítimo sugerir que os níveis de gonadotrofinas no período pré-ovulatório terão influência na futura capacidade de desenvolvimento do CL, assim como a sua capacidade de síntese de P4.

No entanto, as concentrações circulantes de progesterona são resultado da esteroidogénese lútea (produção) e do seu catabolismo, responsável pela sua diminuição. Deste modo, a detecção de um CL com uma grande área lútea, não significa necessariamente que as concentrações plasmáticas de progesterona sejam elevadas. O peso, volume sanguíneo, CC e fluxo sanguíneo hepático são alguns dos factores envolvidos no metabolismo esteróide que vão influenciar as concentrações plasmáticas de progesterona (Lucy, 2001; Siqueira *et al.*, 2009b).

Este conceito de que o aspecto ultrassonográfico dos CL não permite uma quantificação dos valores sanguíneos de P4 é apoiado pelos achados de (Lopes da Costa, 1995) que referiu que, quer a palpação transrectal, quer a ecografia, não identificam as fêmeas com função lútea anómala, para as quais o único método expedito de despiste, actualmente disponível, é o doseamento da P4 por *Kits* rápidos de campo. Assim, o autor sugere que teria sido vantajoso para o presente ensaio, realizarem-se doseamentos plasmáticos de P4, nos dias das medições do CL, mas por falta de apoio financeiro, tal não foi possível.

Foi descrita por alguns autores uma correlação positiva entre a P4 circulante no dia da TE e a taxa de gestação subsequente (Niemann, Sacher & Elsaesser, 1985; King, Odde, Lefever, Brown & Neubauer, 1986). Contudo, em vários trabalhos (Hasler, Bowen, Nelson & Seidel, 1980; Perrin, Humblot, Jeanguyot, Nibart & Thibier, 1987; Chagas e Silva, 2007) foram comparados os valores de progesterona plasmática e a fertilidade subsequente e não foi encontrada qualquer relação entre a P4 plasmática e a probabilidade de estabelecimento de gestação. Tal pode ficar a dever-se a diferenças nos métodos utilizados no doseamento de progesterona plasmática e variações nos valores de progesterona plasmática ao longo do dia (Vasconcelos, Sangsritavong, Tsai & Wiltbank, 2003) e do ano (Rensis & Scaramuzzi, 2003). A P4 tem uma actividade local mais intensa no corno uterino ipsilateral ao CL, visto que é lá que se vai estabelecer o embrião, e os valores de P4 nesse local diferem dos valores plasmáticos (Pope, Maurer & Stormshak, 1982; Wijayagunawardane *et al.*, 1996). Para além dos factores atrás referidos, também o número de receptores para a P4 no endométrio (Stanchev *et al.*, 1991), entre outros factores associados ao embrião, podem influenciar a taxa de gestação.

Deste modo, apesar de possibilitar uma estimativa da capacidade esteroidogénica do CL, como está descrito na bibliografia, a medição da área lútea do CL ao dia 7 não permitiu no presente ensaio, de alguma forma, obter qualquer correlação com o resultado do DG.

Quanto à relação entre a variável “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)” e os grupos DG+ e DG-, neste caso os dados evidenciaram diferenças entre a distribuição desta variável entre os grupos DG+ e DG-. Como é visível no gráfico 7, a distribuição das áreas do CL ao dia 14 nas vacas com DG- apresentaram uma maior dispersão, em que os valores mais baixos podem ter origem em vacas cujo CL já se encontra em regressão ou que sofrem de subfunção lútea. Já os valores excessivamente elevados da área do CL, apesar dos factores

já referidos que afectam a produção de P4, estão de certo modo, de acordo com os achados de Farin e Farin (1995) e Nogueira *et al.* (2004), que apesar de se referirem ao dia 7 e não ao dia 14, relataram que níveis excessivamente elevados de P4 têm um impacto negativo nas taxas de gestação. Estas diferenças podem ser resultado também de uma maior facilidade na determinação da área do CL nesta fase do ciclo dada a sua ecogenicidade distinta da do estroma ovárico e os seus limites bem marcados (Battocchio *et al.*, 1999).

#### 4.4.5 Estudos de caso

Das vacas do presente estudo, duas do G-DOVS exibiram cio 10 e 12 dias após a IA e duas do G-OVS exibiram cio aos dias 15 e 16. Moreira *et al.* (2000) consideraram que as novilhas que expressaram cio menos de 16 dias após a IATF apresentaram uma fase lútea reduzida. A estas fases lúteas de curta duração atribuíram três possíveis causas: falha da regressão do CL em resposta à PGF<sub>2α</sub>; falha da segunda GnRH em provocar ovulação; e a existência de um CL de vida curta resultante da ovulação. As vacas do presente estudo enquadram-se na terceira situação, uma vez que com a ultrassografia no dia da IA se confirmou a regressão do CL enquanto que na ultrassonografia ao dia 7 se confirmou a resposta ovulatória, detectando-se um CL no ovário no qual tinha sido identificado o FD no dia 0. Estes CL de vida curta podem resultar de inúmeras causas, das quais o autor salienta a possível libertação de PGF<sub>2α</sub> endógena como consequência da manipulação durante o processo de medição do CL e a possibilidade dos CL exibirem uma regressão prematura como consequência de uma dose de GnRH reduzida aquando da sincronização das ovulações. Richardson, Mortimer e Whittier (2010) relataram que um clínico inexperiente causava uma maior percentagem de mortalidade fetal durante um DG, que um clínico experiente, mesmo quando o DG era realizado por ultrassonografia. No presente estudo, as avaliações ultrassonográficas foram realizadas num período em que as fêmeas são ainda mais susceptíveis à manipulação. No entanto, o útero só foi manipulado ao dia 30 pós-IA para realização do DG. Até aí, foram manipulados apenas os ovários para determinação das dimensões das estruturas ováricas. Quanto ao efeito da dose de GnRH utilizada nos protocolos de sincronização de ovulações, Macmillan, Segwagwe e Pino (2003) afirmaram que, a simples monitorização da resposta ovulatória não é o suficiente para determinar se uma determinada dose de GnRH é a indicada para um protocolo de sincronização de ovulações, uma vez que não permite determinar se um CL terá função e duração adequadas. Referiram também que vacas cujas ovulações foram induzidas com uma dose de GnRH de 250 µg, os FD ovulados eram de dimensões inferiores e com um CL detectável mais tardiamente do que vacas que ovularam espontaneamente. Propuseram também que a utilização de doses inferiores a 250 µg poderiam originar diferenças ainda maiores quanto à funcionalidade dos CL resultantes de sincronização de ovulações. Deste modo, a reduzida

dose de GnRH (200 µg) utilizada nos protocolos no presente estudo podem ter contribuído para estas fases lúteas de curta duração.

Uma outra vaca apresentou um folículo com um diâmetro crescente em todas as ultrassonografias realizadas (dias 0, 7, 14, 21). Uma vez que esta vaca pertencia ao G-OVS, ou seja, a sua ovulação seria induzida por uma administração de GnRH exógena, esta falha em ovular pode dever-se a dois motivos. Um deles seria uma falha da hipófise anterior em responder à administração de GnRH e, assim, a inexistência pico de LH para induzir a ovulação. O outro, seria uma falha a nível do ovário, onde o folículo, apesar de apresentar uma morfologia normal (diâmetro 13,4 mm) poderia ser incapaz de responder aos níveis de LH, por ser deficitário em receptores para LH, a nível da granulosa.

No presente ensaio não foi detectada nenhuma dupla ovulação, apesar de, por vezes, terem sido detectados dois folículos no dia da IA, ao dia 7 encontrou-se apenas um CL. Estes resultados não estão de acordo com os achados de Fricke e Wiltbank (1999) que relataram uma taxa de duplas ovulações, após a aplicação de um protocolo Ovsynch, de 14,1%. A disparidade pode dever-se a diferenças a nível de factores produtivos, genéticos ou à falta de dimensão da amostra do presente estudo.

#### 4.4.6 Crítica

O presente estudo não permitiu detectar algumas das diferenças que as especulações intelectuais faziam prever. Assim, o autor aponta como possíveis limitações ao presente trabalho: a reduzida amostragem do estudo; a impossibilidade de caracterizar com maior rigor as produções leiteiras de cada vaca; a impossibilidade de realizar doseamentos plasmáticos de P4 em momentos chave do estudo e, por fim, a limitação no tipo de animais que foi permitido utilizar.

Para o autor, o ultimo ponto é de particular importância uma vez que Öztürk *et al.* (2010) relataram que as maiores diferenças de fertilidade entre o Ovsynch e o Doublesynch se encontravam, quando eram aplicados a vacas primíparas e em anestro. Ora, no presente estudo o proprietário dos animais não estava disponível para utilizar vacas em anestro em protocolos de sincronização de ovulação uma vez que as possibilidades de retorno financeiro do investimento nesses animais eram mais reduzidas. Quanto às vacas primíparas, dada a reduzida dimensão da exploração e aos exigentes critérios de selecção dos animais para participarem no estudo, o tempo necessário para recolher esses dados seria demasiado longo, tendo em conta a duração normal do estágio curricular. Assim, foi necessária a utilização tanto de vacas primíparas como multíparas.

#### 4.5 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que o diâmetro dos FD das vacas do G-PG foi superior ao dos restantes grupos e que entre o G-OVS e G-DOVS não foram detectadas quaisquer diferenças entre as dimensões das estruturas ovárias (FD e CL) dos animais sujeitos aos dois protocolos, que justificassem as diferenças de fertilidade encontradas por outros autores.

Quanto à correlação entre as variáveis “Diâmetro do Folículo (mm)” e “Área do Corpo Lúteo-D7 (cm<sup>2</sup>)”, “Área do Corpo Lúteo-D14 (cm<sup>2</sup>)”, “Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm<sup>2</sup>)” e “Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)”, o presente trabalho não possibilitou a detecção de qualquer correlação entre as variáveis.

Por fim, apesar de não terem sido detectadas diferenças entre as dimensões dos FD e CL aos 7 dias entre as vacas com DG+ e DG-, o presente estudo permitiu a detecção de diferenças a nível das dimensões do CL aos 14 dias entre os animais com diferentes DG (+ ou -).

Assim, podemos concluir que para a detecção de diferenças estatisticamente significativas a nível das dimensões das estruturas ovárias de vacas sujeitas a diferentes protocolos de sincronização de ovulação, teria sido ideal a utilização de grupos com uma maior dimensão, de maneira a poder contornar todos os factores que podem ter contribuído para uma eventual atenuação dessas diferenças.

## **5 BIBLIOGRAFIA**



- Ahmad, N., Beam, S. W., Butler, W. R., Deaver, D. R., Duby, R. T., Elder, D. R., Fortune, J. E., Griel, L. C., Jones, L. S., Milvae, R. A., Pate, J. L., Revah, I., Schreiber, D. T., Townson, D. H., Tsang, P. C. W. & Inskeep, E. K. (1996). Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *Journal of Animal Science*, 74, 1943–1952.
- Aldrich, J. E. (2007). Basic physics of ultrasound imaging. *Critical Care Medicine*, 35, S131–S137.
- Ball, P. J. H. & Peters, A. R. (2004). *Reproduction in cattle*. (3rd ed.). Oxford, UK; Ames, Iowa: Blackwell Pub.
- Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L. & Palmer, C. W. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, 69, 714–723.
- Battocchio, M., Gabai, G., Mollo, A., Veronesi, M. C., Soldano, F., Bono, G. & Cairoli, F. (1999). Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology*, 51, 1059–1069.
- Beal, W. E., Perry, R. C. & Corah, L. R. (1992). The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 70, 924–929.
- Bisinotto, R. S., Chebel, R. C. & Santos, J. E. P. (2010). Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *Journal of dairy science*, 93, 3578–3587.
- Bleach, E. C. L., Glencross, R. G. & Knight, P. G. (2004). Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. *Reproduction*, 127, 621–629.
- Bollwein, H., Meyer, H. H. D., Maierl, J., Weber, F., Baumgartner, U. & Stolla, R. (2000). Transrectal doppler sonography of uterine blood flow in cows during the estrous cycle. *Theriogenology*, 53, 1541–1552.
- Bollwein, H., Baumgartner, U. & Stolla, R. (2002). Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. *Theriogenology*, 57, 2053–2061.
- Butler, W. R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, 83, 211–218.
- Carrière, P. D., Gnemmi, G., DesCôteaux, L., Matsui, M. & Colloton, J. (2010). Bovine ovary. In *Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography*. (pp. 35–59). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Cavalieri, J., Hepworth, G., Fitzpatrick, L. A., Shephard, R. W. & Macmillan, K. L. (2006). Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, 65, 45–64.
- Chagas e Silva, J. N. (2007). Ovulação múltipla e transferência embrionária em ruminantes de aptidão leiteira em Portugal. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa (Portugal).
- Contreras Ortiz, S. H., Chiu, T. & Fox, M. D. (2012). Ultrasound image enhancement: A review. *Biomedical Signal Processing and Control*, 7, 419–428.
- Davies, K. L., Bartlewski, P. M., Pierson, R. A. & Rawlings, N. C. (2006). Computer assisted image analyses of corpora lutea in relation to peripheral concentrations of

progesterone: A comparison between breeds of sheep with different ovulation rates. *Animal Reproduction Science*, 96, 165–175.

- DesCôteaux, L., Picard-Hagen, N., Durocher, J., Buczinski, S., Colloton, J., Chastant-Maillard, S. & Curran, S. (2010a). Bovine fetal development after 55 days, fetal sexing, anomalies, and well-being. In *Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography*. (pp. 101–124). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- DesCôteaux, L., Colloton, J., Gayrard, V. & Picard-Hagen, N. (2010b). Bovine pregnancy. In *Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography*. (pp. 81–100). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- DesCôteaux, L., Chastant-Maillard, S., Gnemmi, G., Colloton, J. & Bollwein, H. (2010c). Bovine Uterus. In *Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography*. (pp. 61–80). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Endo, N., Nagai, K., Tanaka, T. & Kamomae, H. (2012). Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Animal Reproduction Science*, 134, 112–118.
- Farin, P. W. & Farin, C. E. (1995). Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biology of reproduction*, 52, 676–682.
- Fricke, P. M., Guenther, J. N. & Wiltbank, M. C. (1998). Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 50, 1275–1284.
- Fricke, P. M. & Wiltbank, M. C. (1999). Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology*, 52, 1133–1143.
- Fricke, P. M. (2002). Scanning the future—Ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85, 1918–1926.
- Fricke, P. M., Caraviello, D. Z., Weigel, K. A. & Welle, M. L. (2003). Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *Journal of dairy science*, 86, 3941–3950.
- Gayrard, V., Carrière, P. D. & DesCôteaux, L. (2010). Principles and recommendations in ultrasound imaging. In *Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography* (pp. 3–20). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Ginther, O. J. (1995a). *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Cattle Book 3*. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Pub.
- Ginther, O. J. (1995b). *Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography Book 4*. Cross Plains, WI, USA: Equiservices Pub.
- Gnemmi, G. & Lefebvre, R. (2010). Bull anatomy and ultrasonography of the reproductive tract. In *Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography*. (pp. 143–162). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Gordon, I. (1996). *Controlled reproduction in cattle and buffaloes*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International.
- Gordon, I. (2004). *Reproductive technologies in farm animals*. Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA: CABI Pub.

- Griffin, P. G. & Ginther, O. J. (1992). Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. *Journal of animal science*, 70, 953–972.
- Gümen, A., Guenther, J. N. & Wiltbank, M. C. (2003). Follicular Size and Response to Ovsynch Versus Detection of Estrus in Anovular and Ovular Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 86, 3184–3194.
- Hanzen, C. H., Pieterse, M., Scenczi, O. & Drost, M. (2000). Relative Accuracy of the Identification of Ovarian Structures in the Cow by Ultrasonography and Palpation Per Rectum. *The Veterinary Journal*, 159, 161–170.
- Hasler, J. F., Bowen, R. A., Nelson, L. D. & Seidel, G. E., Jr. (1980). Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. *Journal of reproduction and fertility*, 58, 71–77.
- Herbener, T. E. (1996). Ultrasound physics: principles of ultrasonography. *Gastrointestinal Endoscopy*, 43, S4–S5.
- Herzog, K. & Bollwein, H. (2007). Application of doppler ultrasonography in cattle reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 51–58.
- Hopkins, S. M. (2003). Reproductive Patterns of Cattle. In *McDonald's veterinary endocrinology and reproduction*. (pp. 395-412) Ames, Iowa: Iowa State Press.
- Jeffrey, S. S. (2007). Clinical Reproductive Physiology of the cow. In *Current therapy in large animal theriogenology* (2nd ed.). (pp. 258-270) St. Louis, Mo: Saunders Elsevier.
- Kahn, W., Volkmann, D. & Kenney, R. M. (2004). *Veterinary reproductive ultrasonography*. Hannover: Schlütersche.
- Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R. & Ginther, O. J. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology*, 33, 1269–1278.
- Kastelic, J. P. & Brito, L. F. C. (2012). Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. *Reproduction in domestic animals*, 47, 45–51.
- King, A. M. (2006). Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. *The Veterinary Journal*, 171, 408–420.
- King, M. E., Odde, K. G., Lefever, D. G., Brown, L. N. & Neubauer, C. J. (1986). Synchronization of estrus in embryo transfer recipients receiving demi-embryos with Syncro-Mate B or estrumate. *Theriogenology*, 26, 221–229.
- Lamb, G. C. & Fricke, P. M. (s.d.). Ultrasound - Early pregnancy diagnosis and fetal sexing. Retrieved June 5, 2013, from <http://www.beefusa.org/udocs/pr101-ultrasound.pdf>.
- Lang, J. (2006a). Doppler ultrasound. In *Diagnostic ultrasound in small animal practice* (pp. 216–226).
- Lang, J. (2006b). Ultrasound Artefacts. In *Diagnostic ultrasound in small animal practice* (pp. 20–25).
- Lonergan, P. (2011). Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology*, 76, 1594–1601.

- Lopes, A. S., Butler, S. T., Gilbert, R. O. & Butler, W. R. (2007). Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 99, 34–43.
- Lopes da Costa, L. F. (1995). Estudo sobre a Utilização das Raças Bovinas Autóctones Portuguesas Alentejana e Mertolenga como Dadoras e Receptoras de Embriões. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa (Portugal).
- Lopez, H., Satter, L. & Wiltbank, M. (2004). Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 81, 209–223.
- Lucy, M. C., Thatcher, W. W., Collier, R. J., Simmen, F. A., Ko, Y., Savio, J. D. & Badinga, L. (1995). Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. *Domestic animal endocrinology*, 12, 73–82.
- Lucy, M. C. (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science*, 84, 1277–1293.
- Lynch, C. O., Kenny, D. A., Childs, S. & Diskin, M. G. (2010). The relationship between periovulatory endocrine and follicular activity on corpus luteum size, function, and subsequent embryo survival. *Theriogenology*, 73, 190–198.
- Macmillan, K. L., Segwagwe, B. V. E. & Pino, C. S. (2003). Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Animal Reproduction Science*, 78, 327–344.
- Mann, G. & Lamming, G. (1999). The Influence of Progesterone During Early Pregnancy in Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 34, 269–274.
- Mann, G., Fray, M. & Lamming, G. (2006). Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Veterinary journal*, 171, 500–503.
- Mannion, P. (2006). Principles of diagnostic ultrasound. In *Diagnostic ultrasound in small animal practice* (pp. 1–19).
- Mateus, L., Lopes da Costa, L., Bernardo, F. & Robalo Silva, J. (2002). Influence of Puerperal Uterine Infection on Uterine Involution and Postpartum Ovarian Activity in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 37, 31–35.
- McNeill, R. E., Diskin, M. G., Sreenan, J. M. & Morris, D. G. (2006). Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology*, 65, 1435–1441.
- Medan, M. S. & Abd El-Aty, A. M. (2010). Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction. *Journal of Advanced Research*, 1, 123–128.
- Mee, M. O., Stevenson, J. S., Alexander, B. M. & Sasser, R. G. (1993). Administration of GnRH at estrus influences pregnancy rates, serum concentrations of LH, FSH, estradiol-17 beta, pregnancy-specific protein B, and progesterone, proportion of luteal cell types, and in vitro production of progesterone in dairy cows. *Journal of Animal Science*, 71, 185–198.
- Milvae, R. A., Hinckley, S. T. & Carlson, J. C. (1996). Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 45, 1327–1349.

- Moreira, F., de la Sota, R. L., Diaz, T. & Thatcher, W. W. (2000). Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *Journal of Animal Science*, 78, 1568–1576.
- Moreira, F., Orlandi, C., Risco, C. A., Mattos, R., Lopes, F. & Thatcher, W. W. (2001). Effects of Presynchronization and Bovine Somatotropin on Pregnancy Rates to a Timed Artificial Insemination Protocol in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 84, 1646–1659.
- Mulligan, F., O'Grady, L., Rice, D. & Doherty, M. (2006). Production diseases of the Transition cow: Body condition score and energy balance. *Irish Veterinary Journal*, 59.
- Nautrup, C. P. (2000). *An atlas and textbook of diagnostic ultrasonography of the dog and cat*. London: Manson : Veterinary Press.
- Niemann, H., Sacher, B. & Elsaesser, F. (1985). Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 23, 631–639.
- Nogueira, M. F. G., Melo, D. S., Carvalho, L. M., Fuck, E. J., Trinca, L. A. & Barros, C. M. (2004). Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2alpha and eCG? *Theriogenology*, 61, 1283–1290.
- Nyland, T. G., Mattoon, J. S., Herrgesell, E. J. & Wisner, E. R. (2002). Physical principles, instrumentation, and safety of diagnostic ultrasound. In *Small animal diagnostic ultrasound* (2<sup>a</sup> ed.). (pp. 1–18). W.B. Saunders Co.
- Öztürk, ö. A., Cirit, ü., Baran, A. & Ak, K. (2010). Is Doublesynch protocol a new alternative for timed artificial insemination in anestrus dairy cows. *Theriogenology*, 73, 568–576.
- Perrin, J., Humblot, P., Jeanguyot, N., Nibart, M., & Thibier, M. (1987). Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology*, 27, 240.
- Perry, G. A., Smith, M. F., Roberts, A. J., MacNeil, M. D. & Geary, T. W. (2006). Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *Journal of Animal Science*, 85, 684–689.
- Peter, A. T., Levine, H., Drost, M. & Bergfelt, D. R. (2009). Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*, 71, 1343–1357.
- Peters, K. E., Bergfeld, E. G., Cupp, A. S., Kojima, F. N., Mariscal, V., Sanchez, T., Wehrman, M. E., Grotjan, H. E., Hamernik, D. L. & Kittok, R. J. (1994). Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. *Biology of Reproduction*, 51, 1248–1254.
- Pope, W. F., Maurer, R. R. & Stormshak, F. (1982). Distribution of progesterone in the uterus, broad ligament, and uterine arteries of beef cows. *The Anatomical record*, 203, 245–250.
- Pursley, J. R., Mee, M. O. & Wiltbank, M. C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH. *Theriogenology*, 44, 915–923.
- Pursley, J. R., Wiltbank, M. C., Stevenson, J. S., Ottobre, J. S., Garverick, H. A. & Anderson, L. L. (1997a). Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers

inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of Dairy Science*, 80, 295–300.

Pursley, J. R., Kosorok, M. R. & Wiltbank, M. C. (1997b). Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *Journal of Dairy Science*, 80, 301–306.

Quintal-Franco, J. A., Kojima, F. N., Melvin, E. J., Lindsey, B. R., Zanella, E., Fike, K. E., Wehrman, M. E., Clopton, D. T. & Kinder, J. E. (1999). Corpus luteum development and function in cattle with episodic release of luteinizing hormone pulses inhibited in the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 61, 921–926.

Quintela, L. A., Pablo, C. D., Herradón, P. G., Martínez, A. P. & González, J. B. (2006). *Ecografía y reproducción en la vaca*. Santiago de Compostela: Universidade de Santiago de Compostela.

Quintela, L. A., Barrio, M., Peña, A. I., Becerra, J. J., Cainzos, J., Herradón, P. G., & Díaz, C. (2012). Use of ultrasound in the reproductive management of dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 34–44.

Randel, R. D., Lammoglia, M. A., Lewis, A. W., Neuendorff, D. A. & Guthrie, M. J. (1996). Exogenous PGF(2)alpha enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. *Theriogenology*, 45, 643–654.

Rekawiecki, R., Nowik, M. & Kotwica, J. (2005). Stimulatory effect of LH, PGE2 and progesterone on StAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3beta hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 78, 169–184.

Rensis, F. D. & Scaramuzzi, R. J. (2003). Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. *Theriogenology*, 60, 1139–1151.

Richardson, R. D., Mortimer, R. G. & Whittier, J. C. (2010). Comparison of Fetal Losses from Diagnosis of Pregnancy Using Ultrasonography or Rectal Palpation in Beef Heifers by Novice or Experienced Technicians. *The Professional Animal Scientist*, 26, 341–346.

Robinson, R. S., Hammond, A. J., Nicklin, L. T., Schams, D., Mann, G. E. & Hunter, M. G. (2006). Endocrine and cellular characteristics of corpora lutea from cows with a delayed post-ovulatory progesterone rise. *Domestic Animal Endocrinology*, 31, 154–172.

Sá Filho, M. F., Crespilho, A. M., Santos, J. E. P., Perry, G. A. & Baruselli, P. S. (2010). Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science*, 120, 23–30.

Sauerwein, H., Miyamoto, A., Günther, J., Meyer, H. H. & Schams, D. (1992). Binding and action of insulin-like growth factors and insulin in bovine luteal tissue during the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96, 103–115.

Schäberle, W. (2005). Fundamental Principles. In *Ultrasonography in vascular diagnosis a therapy-oriented textbook and atlas*. Berlin; New York: Springer.

Schemm, S. R., Deaver, D. R., Griel, L. C., Jr & Muller, L. D. (1990). Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction*, 42, 815–821.

- Senger, P. L. (2005). *Pathways to pregnancy and parturition* (2nd rev. ed.). Pullman, WA: Current Conceptions.
- Simões, R. A. L., Satrapa, R. A., Rosa, F. S., Piagentini, M., Castilho, A. C. S., Ereno, R. L., Trinca, L. A., Nogueira, M., Buratini, J. & Barros, C. M. (2012). Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. *Theriogenology*, 77, 139–147.
- Singh, J., Adams, G. P. & Pierson, R. A. (2003). Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, 78, 371–399.
- Siqueira, L. G. B., Torres, C. A. A., Amorim, L. S., Souza, E. D., Camargo, L. S. A., Fernandes, C. A. C. & Viana, J. H. M. (2009a). Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 115, 18–28.
- Siqueira, L. G. B., Torres, C. A. A., Souza, E. D., Monteiro, P. L. J., Jr, Arashiro, E. K. N., Camargo, L. S. A., Fernandes, C. A. C. & Viana, J. H. M. (2009b). Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology*, 72, 949–958.
- Stanchev, P. D., Rodriguez-Martinez, H., Albiñ, A., Eriksson, H., Gustafsson, H. & Larsson, K. (1991). Concentrations of nuclear progesterone receptors in endometrium of virgin and repeat breeder heifers after embryo transfer. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A*, 38, 271–280.
- Stronge, A. J. H., Sreenan, J. M., Diskin, M. G., Mee, J. F., Kenny, D. A. & Morris, D. G. (2005). Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*, 64, 1212–1224.
- Stroud, B. & Durocher, J. (2010). Bovine embryo transfer, in vitro fertilization, special procedures, and cloning. In *Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography* (pp. 125–142). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Thatcher, W. W., Moreira, F., Pancarci, S. M., Bartolome, J. A. & Santos, J. E. P. (2002). Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, 243–254.
- Tom, J. W., Pierson, R. A. & Adams, G. P. (1998). Quantitative echotexture analysis of bovine ovarian follicles. *Theriogenology*, 50, 339–346.
- Trimberger, G. W. & Davis, H. P. (1943). *Conception Rate in Dairy Cattle by Artificial Insemination of Various Stages of Estrus*. Neb. Agric. Exp. Sta. Res. Bull.
- Utt, M. D., Johnson, G. L. & Beal, W. E. (2009). The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology*, 71, 707–715.
- Vanholder, T., Opsomer, G. & de Kruif, A. (2006). Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 105–119.
- Vasconcelos, J. L., Silcox, R. W., Rosa, G. J., Pursley, J. R. & Wiltbank, M. C. (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52, 1067–1078.

- Vasconcelos, J. L., Sartori, R., Oliveira, H. N., Guenther, J. G. & Wiltbank, M. C. (2001). Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, 56, 307–314.
- Vasconcelos, J. L. M., Sangsritavong, S., Tsai, S. J. & Wiltbank, M. C. (2003). Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology*, 60, 795–807.
- Wijayagunawardane, M. P., Cerbito, W. A., Miyamoto, A., Acosta, T. J., Takagi, M., Miyazawa, K. & Sato, K. (1996). Oviductal progesterone concentration and its spatial distribution in cyclic and early pregnant cows. *Theriogenology*, 46, 1149–1158.
- Williams, D. (2012). The physics of ultrasound. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 13, 264–268.
- Wiltbank, M., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S. & Gümen, A. (2006). Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*, 65, 17–29.
- Wiltbank, M. C., Sartori, R., Herlihy, M. M., Vasconcelos, J. L. M., Nascimento, A. B., Souza, A. H., Ayres, H., Cunha, A. P., Keskin, A., Guenther, J. N. & Gümen, A. (2011). Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 76, 1568–1582.



## **6 ANEXOS**

Tabela 2. Resumo dos dados do presente estudo.

Grupo		Diametro do folículo (mm)	Área do Corpo Lúteo-D7 (cm <sup>2</sup> )	Área do Corpo Lúteo-D14 (cm <sup>2</sup> )	Diferença Área do Corpo Lúteo-D14-D7 (cm <sup>2</sup> )	Produção de leite no dia de contraste do mês de IA (L)
G-PG	N	15	15	15	15	15
	Média	15,6300	3,233	3,060	-,173	34,213
	Desvio padrão	2,61956	,8147	,3641	,6307	6,6232
	Mediana	14,8000	3,000	3,200	0,000	32,000
	Mínimo	11,00	2,4	2,4	-2,3	26,0
	Máximo	20,00	5,8	3,5	,4	46,0
G-OVS	N	15	14	14	14	15
	Média	13,6800	3,571	3,079	-,493	34,107
	Desvio padrão	1,05234	1,0586	,7895	1,0535	6,7247
	Mediana	14,0000	3,200	3,100	-,100	34,800
	Mínimo	10,70	2,1	1,2	-2,3	25,1
	Máximo	15,20	5,4	4,9	1,9	46,0
G-DOVS	N	15	15	13	13	15
	Média	13,9467	2,833	2,862	,085	34,780
	Desvio padrão	1,84618	,5434	,5189	,3288	5,6990
	Mediana	13,6000	2,900	2,900	0,000	34,000
	Mínimo	11,20	1,3	1,2	-,3	21,4
	Máximo	16,90	3,4	3,2	,8	44,0
Total	N	45	44	42	42	45
	Média	14,4189	3,205	3,005	-,200	34,367
	Desvio padrão	2,09342	,8621	,5755	,7580	6,2266
	Mediana	14,0000	3,000	3,100	-,050	33,000
	Mínimo	10,70	1,3	1,2	-2,3	21,4
	Máximo	20,00	5,8	4,9	1,9	46,0